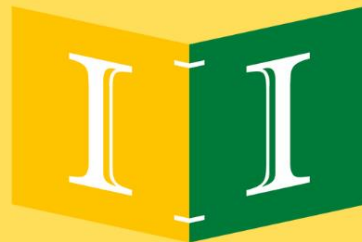


"Síntesis de nanoporos de TiO_2 dopados con plata y cobre con potencial actividad antimicrobiana".

Claudia Celeste Gutiérrez Pérez



INSTITUTO DE INGENIERÍA
Universidad Autónoma de Baja California
EXCELENCIA E INNOVACIÓN EN INGENIERÍA

TESIS POSGRADO 2022

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

INSTITUTO DE INGENIERÍA

MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA



“Síntesis de nanoporos de TiO_2 dopados con plata y cobre con potencial actividad antimicrobiana”

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

Claudia Celeste Gutiérrez Pérez

DIRECTOR

Dr. Ernesto Alonso Beltrán Partida

CODIRECTOR

Dr. Benjamín Valdez Salas

Mexicali, B. C., agosto de 2022

ABSTRACT

Titanium (Ti), and its alloys have been considered as one of the most used metal materials in the biomaterial field. They are used for designing and producing joint prostheses, osteosynthesis plates, fixing screws and dental implants. Furthermore, Ti is used because of its excellent biocompatibility characteristics, its beneficial mechanical properties, and its high resistance to corrosion. Due to the increase of population's life expectancy, the demand for Ti implants is higher as well as the presence of diseases or conditions that require the use of these implants. In addition, there is a significant failure percentage in prosthetic implants caused by bacterial infections; for example, perimplantitis. For that reason, it is necessary to produce Ti implants that are capable of inhibiting bacterial growth on the material surface. In this research, a new synthesis methodology to modify grade 5 Titanium aiming to inhibit bacterial growth was developed. Four different substrates were synthesized. They were modified to give them nanopores of TiO_2 , afterwards, they were doped with silver nanoparticles (AgNPs), copper nanoparticles (CuNPs), and finally, a combination of both nanoparticles (Ag/CuNPs). The materials were characterized by using Scanning Electron Microscopy (SEM), Energy Dispersive Spectroscopy (EDS), X-ray Diffraction (XRD) and contact angle. On the other hand, the wide spectrum of antimicrobial capacity of these new surface coating technologies was evaluated with early adhesion tests and viable plate count. Finally, immune response testing using RAW 264.7 cell line was carried out.

This investigation project demonstrated that Ag/CuNPs enhanced the antibacterial activity compared to the dopes of AgNPs and CuNPs. Furthermore, experimental substrates promoted macrophages adhesion; however, Ag/Cu dope promoted a higher cell viability.

RESUMEN

El titanio (Ti), y sus aleaciones, se ha considerado como uno de los materiales metálicos más utilizados en el campo de los biomateriales, para el diseño y fabricación de prótesis articulares, placas de osteosíntesis, tornillos de fijación e implantes dentales. Por otra parte, el Ti se utiliza debido a sus excelentes características biocompatibles, sus benéficas propiedades mecánicas y su alta resistencia a la corrosión. Debido al incremento en la esperanza de vida de la población, es mayor la demanda de los implantes de Ti, y como consecuencia también la presencia de enfermedades o condiciones que derivan en la necesidad del uso de estos implantes. Además, existe un porcentaje de fallo considerable en la implantación de prótesis, provocada por infecciones bacterianas, por ejemplo, periimplantitis. Por este motivo se requiere fabricar implantes de Ti capaces de inhibir el crecimiento bacteriano sobre la superficie del material. En este trabajo se desarrolló una nueva metodología de síntesis para la modificación de Ti grado 5 con el objetivo de inhibir el crecimiento microbiano. Se sintetizaron cuatro diferentes sustratos, los cuales fueron modificados para generarles nanoporos de TiO_2 , para posteriormente doparlos con nanopartículas de plata (AgNPs), con nanopartículas de cobre (CuNPs) y finalmente la combinación de ambas nanopartículas (Ag/CuNPs). Los materiales se caracterizaron utilizando microscopía electrónica de barrido (SEM), espectroscopía de energía dispersiva (EDS), difracción de rayos X (XRD) y ángulo de contacto. Por otra parte, se evaluó la capacidad antimicrobiana de amplio espectro de estas nuevas tecnologías en recubrimientos superficiales a través de ensayos de adhesión temprana conteo viable en placa. Finalmente, se realizaron pruebas de respuesta inmune utilizando la línea celular RAW 264.7.

Este proyecto de investigación indicó que las Ag/CuNPs potenciaron la actividad antimicrobiana en comparación de los dopajes de AgNPs y CuNPs. Por otra parte, los sustratos experimentales promovieron la adhesión de macrófagos, sin embargo, el dopaje Ag/Cu promovió una mayor viabilidad celular.

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD

El presente trabajo aporta nuevo conocimiento para la síntesis de un dopaje con Ag, Cu y Ag/Cu por un sencillo y rápido proceso químico en superficies nanoestructuradas de Ti (Ti-6Al-4V). Como resultado, estas superficies dopadas mostraron potente actividad antimicrobiana de amplio espectro frente a un importante número de modelos de interés clínico. Además, la viabilidad de la línea celular (macrófagos) utilizada para los ensayos, sugirió que los dopajes no generan daños citotóxicos, mientras que el sustrato Ag/Cu mostró mayor inducción en la actividad metabólica celular. Los resultados de esta tesis muestran un proceso novedoso, disruptivo e innovador potencialmente escalable a procesos en entorno real para la fabricación en masa de superficies metálicas que requieran dopajes de control microbiológico, y no citotóxicos para aplicaciones biomédicas e industriales.

AGRADECIMIENTOS

En estos momentos agradezco infinitamente al Universo, Dios, a la Casualidad, llámese como se llame, pues han conjugado a mi favor para estar bien.

Siento una inmensa alegría, pues he de decir que tengo más personas a las cuales agradecer que páginas por mostrar.

He aprendido tanto en los últimos dos años que es curioso sentir que esto es apenas el comienzo, el tiempo ha pasado volando...

Agradezco infinitamente a mis padres por apoyarme en todos mis proyectos, para ser una profesionalista mejor preparada, pero de igual forma, mejor ser humano, sé que no ha sido fácil. Especialmente agradezco a mi madre Elena, que le han tocado los momentos más críticos, agradezco tu ánimo y apoyo incondicional. De igual forma agradezco a mis hermanos y amigos quienes me han acompañado, escuchado y aconsejado durante todo este trayecto.

Agradezco infinitamente a mis tutores pues me han dejado ser y han brindado esta oportunidad, al Dr. Ernesto y Benjamín, les agradezco su paciencia, consejos y confianza.

Agradezco la suerte de tener otra familia, a un amigo, compañero y consejero, gracias Leo.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por su contribución para con el departamento de Biología Molecular y Cáncer, así mismo por la beca que se me fue otorgada.

Por último, agradezco al personal del Instituto de Ingeniería de la UABC por el apoyo recibido en el transcurso de mi estadía y finalmente a todas las personas de las cuales adquiriré nuevos conocimientos, maestros de clase y laboratorio, compañeros de maestría, infinitas gracias por su

confianza y colaboración para mi formación como profesionalista y el más importante como el de ser humano.

DEDICATORIA

A mis padres, hermanos, amigos y pareja.

LISTADO DE SIMBOLOGÍA Y TÉRMINOS

SÍMBOLO	SIGNIFICADO
Ti	Titanio puro (99% pureza)
Ca	Calcio
Fe	Hierro
Co	Cobalto
Zr	Zirconio
Sn	Estaño
Ce	Cerio
Mo	Molibdeno
V	Vanadio
Nb	Niobio
Ta	Tantalio
TiO₂	Dióxido de Titanio
H₂SO₄	Ácido sulfúrico
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
C₂H₅OH	Etanol
AgNO₃	Nitrato de plata
CO₂	Dióxido de carbono
C₂H₆OS	Dimetilsulfóxido
DMSO	Dimetilsulfóxido
MTT	Bromuro de 3-(3,4 -dimetiltiazol-2-il)- 2,5- difeniltetrazolio
Tween 80	Polisorbato 80

RPMI	Siglas en inglés para: Roswell Park Memorial Institute
PBS	Siglas en inglés para: Phosphate buffered saline
CuO	Óxido de cobre
Cu²⁺	Ion de cobre
Ag⁺	Ion de plata
-SH	Grupos tiol
Ti6Al4V	Aleación de Titanio-Aluminio-Vanadio
AgNps	Nanopartículas de plata
NPs	Nanoporos
Ag + Cu	Sustrato dopado de con nanopartículas de plata y cobre
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomona aeruginosa</i>
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>S. enterica</i>	<i>Salmonella enterica</i>
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a metilina
RAW 264.7	Línea celular de macrófagos murinos
ATP	Adenosín trifosfato
ADN	Ácido desoxirribonucleico

ROS	Especies reactivas de oxígeno
M1	Macrófagos tipo M1
M2	Macrófagos tipo M2
SBF	Suero Bovino Fetal
MEC	Matriz Extracelular
nm	Nanómetros
μm	Micrómetros
μL	Microlitros
mg	Miligramos
mm	Milímetros
°C	Grados centígrados
RPM	Revoluciones por minuto
NPs	Nanopartículas
UV	Ultravioleta
α	alfa
β	beta
pH	Coeficiente que indica el grado de acidez
UFC	Unidades formadoras de colonia
TNF	Factor de necrosis tumoral
DO	Densidad Óptica
EDS	Análisis de energía dispersiva de rayo X
SEM	Microscopía electrónica de barrido
EDS	Espectroscopia de energía dispersiva
XRD	Cristalografía de rayos X

WCA	Siglas en inglés para: Water contact angle (ángulo de contacto del agua)
ELISA	Lector de placas
EEUU	Estados Unidos
UABC	Universidad Autónoma de Baja California
CONACYT	Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1.1: Representación esquemática de la fijación de fragmentos óseos mediante, tornillos y placas metálicas [39].</i>	<i>9</i>
<i>Figura 1. 2: Las imágenes muestran las dos posibles estructuras del titanio, la imagen de la izquierda representa la estructura hexagonal compacta (fase α). De lado derecho se observa la estructura cubica centrada en el cuerpo (fase β) [41].</i>	<i>10</i>
<i>Figura 1.3: Representación esquemática de la formación de biopelículas. El proceso comienza con la adhesión reversible de las células procariotas a una superficie (biomaterial). (1). Las bacterias comienzan proliferar sobre la superficie del material (2) Comienza a formarse una monocapa y una unión irreversible mediante la producción de una matriz extracelular (limo) (3). Posteriormente aparece una microcolonia que da lugar a una multicapa (4). Durante las últimas etapas, la biopelícula madura forma estructuras debido a los polisacáridos (5). El último paso</i>	

consiste en la dispersión de algunas células de la biopelícula para poblar más área de la superficie (6). Esta imagen fue creada en BioRender.com.

..... 15

Figura 2.1. Esquema de planificación y fases del proyecto. Esta imagen fue creada en: BioRender.com..... 18

Figura 3.1: La imagen A y B muestran las piezas de titanio grado médico cortadas y lavadas, a la izquierda el cristalizador con los vasos de precipitado de 10 mL donde con pinzas quirúrgicas se colocan los especímenes a modificar, también se visualizan los cronómetros utilizados para llevar a cabo el conteo del tiempo de reacción. En la sección C y D se muestra el procedimiento para la preparación de la solución piraña, iniciando con la rotulación del material para mayor seguridad y precisión, la imagen D muestra la disposición de cada elemento dentro de la campana de extracción para llevar a cabo dicha reacción, al centro se encuentra el cristalizador con hielo y el vaso de precipitados de 140 mL, de lado izquierdo se encuentra el vaso de

precipitados para el ácido sulfúrico con su respectiva pipeta, y al fondo el vaso de precipitados con peróxido de hidrógeno al 30% y su respectiva pipeta. 25

Figura 3.2: En esta imagen se muestran los sustratos dentro de la cabina de bioseguridad para proceder a la esterilización por UV..... 28

Figura 3.3: Representación esquemática del posicionamiento de las muestras tratadas para análisis microbiológico, el análisis se realiza por triplicado. Imagen creada en BioRender.com 35

Figura 3.4: Representación fotográfica del proceso de: A; deposición de la gota de 50µL de microorganismo ajustado a una densidad óptica de 0.026-0.027 sobre la superficie de los sustratos. B; periodo de incubación de los sustratos con microorganismos. C; limpieza de la placa de 24 pozos con etanol (paso previo al lavado de las superficies). D; Introducción de la placa a la campana de flujo laminar. E; proceso de lavado de las superficies con PBS 1X. 36

Figura 3.5: Representación esquemática del proceso para el análisis microbiológico sobre la superficie de los sustratos, esquema realizado en BioRender.com. 37

Figura 4.1: FE-SEM de baja amplificación de las superficies con mesoporos. En las micrografías A y B se observa la rugosidad formada por el tratamiento de oxidación química controlada. Por otra parte, en las micrografías C y D se puede apreciar la formación de picaduras en la superficie del material. Finalmente, las micrografías E y F muestran la distribución de estructuras mesoporosas..... 40

Figura 4.2.: En esta sección se muestra cómo se analizaron las micrografías con la herramienta de análisis de partículas para obtener los tamaños de mesoporos que se formaron en la superficie del sustrato y determinar la eficiencia del grabado químico. En la sección A se observa el contraste de colores entre rojo y gris, la herramienta de medición de poros utiliza el contraste rojo para determinar las secciones identificadas como poros. La imagen B es un acercamiento de la zona donde se

observan en rojo las delimitaciones de los mesoporos. En la zona C observamos el mapa creado por el programa indicando los mesoporos identificados excluyendo todo lo demás, la pequeña gráfica en la parte inferior derecha nos indica el área que abarca la formación de mesoporos por toda la superficie esta se indica como la sección más oscura de la gráfica es decir la curva que observamos en tonalidades oscuras y la zona más clara la parte final de la gráfica de lado derecho nos indica las zonas en las que no hubo formación de mesoporos..... 42

Figura 4.3: Las gráficas presentadas muestran la cuantificación y clasificación del tamaño de mesoporos formados gracias al método de grabado seleccionado, en la sección A se muestran los datos obtenidos del análisis de una selección de micrografías, la gráfica de distribución de frecuencias indica que para la zona elegida de estudio de las micrografías el tamaño de mesoporos con mayor frecuencia fue de 160 nm, y el estudio de distribución normal concluyó que el de mayor tamaño es de nm, en la sección B, el tamaño fue de 47 nm. 43

Figura 4.4: FE-SEM de alta magnificación: en las micrografías A y B se muestra la nanotopografía generada por los NPs. La imagen C muestra una amplificación de una sección de la micrografía B, en la que se observa la forma de los nanoporos..... 44

Figura 4.5: En esta imagen se muestra el estudio realizado con el programa Image J, análisis de partículas, en donde numeramos cada nanoporo encontrado..... 45

Figura 4.6: En esta imagen se muestra el estudio de distribución de frecuencias y distribución normal a partir de las mediciones obtenidas de la micrografía de la Figura 4.4 en la que se determinó que el tamaño de NPs más comúnmente formado es de 11.24 nm..... 46

Figura 4.7: Las gráficas presentadas muestran la cuantificación y clasificación del tamaño de NPs el estudio de distribución de frecuencias señala que otro de los tamaños con mayor probabilidad de formarse es el de 30 nm aproximadamente..... 46

formados gracias al método de grabado seleccionado, en esta última sección los resultados obtenidos por el método de distribución normal nos indica que uno de los tamaños que más comúnmente se formará es de 21.5 nm aproximadamente. 46

Figura 4.8: A) análisis de EDS de los NPs. B) muestra una serie de tres micrografías, la primera de lado izquierdo muestra la imagen con mayor amplitud, las imágenes restantes son ejemplo de las microscopias utilizadas para el estudio completo..... 47

Figura 4.9: Las micrografías A, B y C muestran tres diferentes secciones del sustrato dopado con Ag analizado, las zonas más brillantes muestran la presencia de nanopartículas de plata dopadas a la superficie del material en formas irregulares. La sección D, E y F señalan un acercamiento a las zonas dopadas con nanopartículas de plata y se ilustrando las mediciones de dichas partículas. 50

Figura 4.10: A) muestra el análisis EDS confirmando la presencia de plata. B) acercamiento de la microscopía analizada señala los puntos de análisis. 51

Figura 4.11: Micrografías la presencia de nanopartículas de Cu, como se observa en A). Las imágenes B), C) y D), revelan diferentes secciones y acercamientos de la muestra donde se identifica la morfología de las nanopartículas de Cu y sus dimensiones..... 52

Figura 4.12: A) muestra dos diferentes análisis EDS confirmando la presencia de cobre. B) ilustra el mapeo elemental realizado sobre las nanopartículas de cobre (señal de Cu en rojo y señal de Ti en verde). 53

Figura 4.13: Las micrografías mostradas revelan la presencia de nanopartículas de plata y cobre en la sección A observamos su distribución y tamaños irregulares. B muestra un alejamiento de la zona con nanopartículas..... 54

*Figura 4.11: A) análisis de EDS confirmando la presencia de Ag y Cu.
B) micrografía con amplificación realizado sobre las nanopartículas de plata y cobre encontradas en la superficie. 54*

Figura 4.14: A) muestra la tabla de distribución de frecuencia de los diámetros encontrados con la herramienta de medición de análisis de partículas. B) muestra la micrografía analizada a la izquierda de la gráfica de distribución normal, las tonalidades rojas marcan las secciones con nanopartículas de cobre..... 56

Figura 4.15: A) muestra la tabla de distribución de frecuencia de los diámetros encontrados con la herramienta de medición análisis de partículas. B) muestra la micrografía analizada de la gráfica de distribución normal, las tonalidades rojas marcan las secciones con nanopartículas de Cu y Ag..... 57

Figura 4.16: Se muestra la gráfica obtenida a través de los resultados del análisis de ángulo de contacto, se puede observar que existen diferencias significativas de los sustratos dopados frente al control. 58

Figura 4.17: Análisis de XRD de NPs, el color verde muestra un 49.5% de anatasa una de las formas en que se puede encontrar al dióxido de titanio ($TiO_{2(IV)}$), el color café con un 21.8% del total de los elementos encontrados el cual corresponde a Ti. La sección de color azul celeste es 15.8% muestra una versión de dióxido de titanio de fórmula Ti_4O_8 . El porcentaje del contenido de los elementos encontrados correspondiente al 8.9%, el color gris en la gráfica de pastel corresponde al mineral rutilo compuesto de TiO_2 , y finalmente el porcentaje menor corresponde a titanio puro. 60

..... 61

Figura 4.18: La figura muestra las gráficas del estudio XRD con dopaje de Ag, se puede observar el 42.4% que corresponde al elemento Ti, la parte de la gráfica en color amarillo correspondiente al 36.4% de anatasa, el color marrón denota el porcentaje encontrado del elemento corundum mineral compuesto de óxido de aluminio, la parte coloreada en gris corresponde al elemento plata, la azul claro corresponde al

compuesto Ag (Al O₂) y finalmente el último elemento corresponde AgTi₃.

..... 61

Figura 4.19: Estudio de XRD para el sustrato dopado con Cu. La gráfica

de pastel muestra los porcentajes de los elementos encontrados en el

análisis, en la sección correspondiente al color azul marino se representa

el elemento de Ti puro, la sección en rojo representa el porcentaje

encontrado de cuprita forma mineral del óxido de Cu. La sección en

amarillo representa al el mineral blossomite (vanadato de cobre). La sección

en rosa representa al compuesto anatasa. El color azul claro representa

el porcentaje de tenorita forma mineral del óxido de Cu. En color verde

se encuentra el compuesto de óxido de titanio finalmente el último

compuesto corresponde a óxido de aluminio..... 62

Figura 4.20: Estudio de XRD realizado para el sustrato dopado con Ag y

Cu, los porcentajes más sobresalientes mostrados en la gráfica de pastel

corresponden blossomite (vanadato de cobre anhídrido, color rojo) y en

color azul el elemento de Ag. La sección verde y azul marino en menor

porcentaje corresponden a Cu y anatasa. La sección amarilla, rosa y azul claro representa, óxido de Ti, tenorita(rosa) mineral compuesto de óxido de Cu y finalmente una combinación de Ag y Ti. En la sección marrón y gris encontramos, el compuesto Óxido de Ag(I) Cu(III) y por último Ti. . 63

Figura 4.21: Gráfica de la evaluación de los sustratos frente al microorganismo S. epidermidis, “ns” indica que no hay una diferencia significativa en la comparativa, “” indica que hay una diferencia significativa en la comparativa, “**” indica que hay una diferencia aún más significativa en la comparativa que la indicada sólo por “*”. El sustrato nombrado “Ag+Cu” mostró una mayor capacidad bactericida frente a los demás sustratos evaluados. 65*

Figura 4.22: Gráfica de la evaluación de los sustratos frente al microorganismo S. aureus RM (SARM), “ns” indica que no hay una diferencia significativa en la comparativa, “” indica que hay una diferencia significativa en la comparativa, “**” indica que hay una diferencia aún más significativa en la comparativa que la indicada sólo*

por “”, “***” indica que hay una diferencia aún más significativa en la comparativa que la indicada sólo por “**”. El sustrato nombrado “Ag+Cu” mostró una mayor capacidad bactericida frente a los demás sustratos evaluados. 66*

Figura 4.23: Gráfica de la evaluación de los sustratos frente al microorganismo S. aureus, “ns” indica que no hay una diferencia significativa en la comparativa. Los sustratos no muestran una diferencia significativa entre ellos en ninguna de las comparativas, a pesar de esto todos los sustratos demuestran una capacidad bactericida. 67

Figura 4.24: Gráfica de la evaluación de los sustratos frente al microorganismo P. aeruginosa, “ns” indica que no hay una diferencia significativa en la comparativa. Los sustratos no muestran una diferencia significativa entre ellos en ninguna de las comparativas, a pesar de esto todos los sustratos demuestran una capacidad bactericida, especialmente el denominado “Ag+Cu”, teniendo una inhibición total sobre la superficie. 68

*Figura 4.25: Gráfica de la evaluación de los sustratos frente al microorganismo K. pneumoniae, “ns” indica que no hay una diferencia significativa en la comparativa, “***” indica que hay una diferencia significativa en la comparativa, “****” indica que hay una diferencia aún más significativa en la comparativa que la indicada sólo por “***”. El sustrato nombrado “Ag+Cu” mostró una mayor capacidad bactericida frente a los demás sustratos evaluados. 69*

*Figura 4.26: Gráfica de la evaluación de los sustratos frente al microorganismo E. coli, “ns” indica que no hay una diferencia significativa en la comparativa, “***” indica que hay una diferencia significativa en la comparativa. El sustrato nombrado “Ag+Cu” mostró una mayor capacidad bactericida frente a los demás sustratos evaluados. 70*

*Figura 4.27: Gráfica de la evaluación de los sustratos frente al microorganismo S. enterica, “ns” indica que no hay una diferencia significativa en la comparativa, “***” indica que hay una diferencia*

*significativa en la comparativa, “***” indica que hay una diferencia aún más significativa en la comparativa que la indicada sólo por “**”. El sustrato nombrado “Ag+Cu” mostró una mayor capacidad bactericida frente a los demás sustratos evaluados. 71*

Figura 4.28: Gráfica de la evaluación de los sustratos frente al microorganismo C. albicans, “ns” indica que no hay una diferencia significativa en la comparativa. El sustrato nombrado “Ag+Cu” mostró una mayor capacidad bactericida frente a los demás sustratos evaluados. 72

Figura 4.29: Micrografías de FE-SEM a 4 h de cultivo de macrófagos sobre la superficie de los sustratos modificados. La morfología y proliferación celular se muestra en las cuatro superficies con los diferentes tratamientos. A) muestra la morfología de las células en la superficie dopadas con NPs. B) indica la proliferación en el sustrato nanopartículas de Ag. C ilustra la superficie con nanopartículas de Cu y D con el sustrato dopado Ag+ Cu. 75

Figura 4.30: Micrografías de FE-SEM a 4 horas de incubación de macrófagos sobre la superficie de los sustratos modificados. En este acercamiento podemos observar más detalladamente la presencia de filopodios (flechas amarillas), lamelipodios (círculos amarillos) conexión entre células (círculo rojo) y presencia de MEC (matriz extra celular). El sustrato NPs se'alado con la letra A muestra la aparición de MEC de forma abundante al igual que el sustrato Ag, además de la presencia de filopodios y lamelipodios. El sustrato Cu indicado con la letra C y el sustrato Ag+Cu indicado con la letra D, muestran las conexiones entre células..... 76

Figura 4.31: Micrografías de FE-SEM de alta magnificación de las superficies experimentales. se puede observar más a detalle el cambio morfológico que experimentan las células en cada uno de los sustratos.

D) Se observa el sustrato dopado con Ag+Cu distinguiéndose una célula adherida a la superficie manteniendo una forma más definida y protuberante. Los círculos amarillos muestran la presencia de

lamelipodios, prolongaciones anchas y laminares pueden indicar respuesta de cicatrización de heridas. Las flechas amarillas muestran la presencia de microespículas, que promueven la adhesión local al sustrato afirmándola a la superficie celular. El círculo color naranja en el sustrato nanoporoso muestra una MEC más densa en comparación con los demás sustratos..... 77

Figura 4.32: Micrografías de FE-SEM a alta magnificación de los macrófagos. A) sustrato NPs morfología celular, B) sustrato dopado con nanopartículas de Ag, conduciendo el anclaje celular, C) sustrato dopado con nanopartículas de Cu magnificación de microespícula celular y filopodios circundantes, D) sustrato dopado con Ag+Cu muestra la morfología del anclaje de una célula a la superficie del material. 78

Figura 4.33: Micrográficas de FE-SEM a alta magnificación, el conjunto de imágenes expuestas demuestra las alteraciones en los filopodios de las células macrófagas sobre los materiales nanoestructurados. A: Sustrato NPs, B: Sustrato Ag, C: Sustrato Cu, D:

Sustrato Ag+Cu. Se observa una flecha que indica la presencia de lamelipodio. 79

*Figura 4.34: Resultados comparativos entre los diferentes sustratos con base a los resultados obtenidos de la prueba MTT. * indica cambios significativos. n.s. sugiere que no hay cambios significativos. 81*

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 4.1: Estudio EDS representación de la composición porcentual de los elementos químicos encontrados en la superficie del sustrato modificado nanoporoso.</i>	48
<i>Tabla 4.2: Estudio EDS representación de la composición porcentual de los elementos químicos encontrados en la superficie de una muestra de titanio grado 5 comercial. Fuente: web: bohler.mx/es/recubrimiento/</i>	48
<i>Tabla 4.3: Estudio EDS representación de la composición porcentual de los elementos químicos encontrados en la superficie del sustrato nanoporoso dopado con plata.</i>	51
<i>Tabla 4.4: Estudio EDS representación de la composición porcentual de los elementos químicos encontrados en la superficie del sustrato nanoporoso dopado con cobre (tabla correspondiente a la gráfica mostrada en la Figura 4.9 sección A parte izquierda)</i>	53
<i>Tabla 4.5: Estudio EDS representación de la composición porcentual de los elementos químicos encontrados en la superficie del sustrato nanoporoso dopado con plata y cobre validando la presencia de dichos elementos.</i>	55

ÍNDICE

<i>ABSTRACT</i>	<i>i</i>
<i>RESUMEN</i>	<i>iii</i>
<i>DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD</i>	<i>v</i>
<i>AGRADECIMIENTOS</i>	<i>vi</i>
<i>DEDICATORIA</i>	<i>viii</i>
<i>LISTADO DE SIMBOLOGÍA Y TÉRMINOS</i>	<i>ix</i>
<i>ÍNDICE DE FIGURAS</i>	<i>xiii</i>
<i>ÍNDICE DE TABLAS</i>	<i>xxxi</i>
<i>CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN</i>	<i>1</i>
1.1 ANTECEDENTES	1
1.2 FUNDAMENTO TEÓRICO	5
1.2.1. Biocompatibilidad.....	5
1.2.2. Definición.....	5
1.2.3. Biomateriales	6
1.2.4. Definición	6
1.2.5. Clasificación de los biomateriales	7
1.2.6 Titanio y sus aleaciones utilizado para biomateriales.....	8

1.2.7. Rechazo de implantes metálicos	12
1.2.8. Películas microbianas y su relación con el rechazo de prótesis	13
<i>CAPÍTULO 2 PLANIFICACIÓN Y OBJETIVOS</i>	18
2.1. ESTRATEGIAS METODOLÓGICAS Y PLANIFICACIÓN DEL PROYECTO	18
.....	18
2.2. OBJETIVO GENERAL	19
2.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	19
<i>CAPÍTULO 3 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL</i>	22
3.1. INTRODUCCIÓN	22
3.2. PREPARACIÓN DE LOS SUSTRATOS DE TITANIO PARA LA FORMACIÓN DE MESOPOROS Y NANOPOROS:	23
3.2.1. Preparación de solución para grabado químico.	23
3.3. PREPARACIÓN DE LOS SUSTRATOS DE DIÓXIDO DE TITANIO NANOPOROSOS DOPADOS DE PLATA.	26
3.4. PREPARACIÓN DE LOS SUSTRATOS DE NANOPOROS DE DIÓXIDO DE TITANIO DOPADOS DE COBRE.	26

3.5. PREPARACIÓN DE LOS SUSTRATOS DE NANOPOROS DE DIÓXIDO DE TITANIO DOPADOS DE PLATA Y COBRE.....	27
3.6. PROCESO DE ESTERILIZACIÓN POR MÉTODO DE IRRADIACIÓN UV.....	27
3.7. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA REALIZACIÓN DE ESTUDIO DE ÁNGULO DE CONTACTO.....	28
3.8. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA ANÁLISIS FE-SEM.....	29
3.9. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LAS SUPERFICIES	29
3.10. ANÁLISIS POR DIFRACCIÓN DE RAYOS X.....	29
3.11. CULTIVO CELULAR Y ENSAYOS DE INGENIERÍA DE TEJIDOS	29
3.11.1. Procedimiento para el cultivo de células macrófagas RAW 264.7	30
3.11.2. Procedimiento para expandir células macrófagas RAW 264.7	31
3.11.3. Ensayo de proliferación de macrófagos.....	31
3.11.4. Preparación de las muestras con macrófagos para análisis FE-SEM.	32
3.12. ENSAYO DE ADHESIÓN Y PROLIFERACIÓN DE MICROORGANISMOS SOBRE LAS SUPERFICIES TRATADAS.	33
3.12.1 Preparación del inóculo.....	33
3.12.2 Inoculación del microorganismo sobre las superficies tratadas	34
3.13. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	37

<i>CAPÍTULO 4 ANÁLISIS DE RESULTADOS</i>	39
4.1. CARACTERIZACIÓN DE LOS MESOPOROS Y NPS	40
.....	42
4.2. CARACTERIZACIÓN DE LOS SUSTRATOS DE NANOPOROSOS DE DÍOXIDO DE TITANIO DOPADOS CON PLATA, COBRE Y PLATA, COBRE	49
4.3. ESTUDIO ÁNGULO DE CONTACTO	57
4.4. ESTUDIOS DE DIFRACCIÓN DE RAYOS X (XRD)	59
4.5. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS MICROBIOLÓGICOS	64
4.6 ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DEL COMPORTAMIENTO CELULAR FRENTE A LOS SUSTRATOS MODIFICADOS	73
<i>DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES</i>	82
<i>RECOMENDACIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS</i>	86
<i>REFERENCIAS</i>	87

CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN

1.1 ANTECEDENTES

Desde la década de 1950 el aumento de los tratamientos de extracción de articulaciones dañadas, por replazos artificiales se ha mantenido como estrategia esencial para el manejo terapéutico de las enfermedades articulares graves. Dentro de ellas, la artritis es una enfermedad que provoca inflamación o degeneración de una o más articulaciones, lo que ocasiona que el espacio entre los huesos se reduzca, provocando un agudo dolor y discapacidad motriz de quien lo padece, siendo especialmente vulnerable la población mayor a 65 años y en menor medida la de edad menor a 45 años. [1]

La osteoartritis primaria y secundaria son las afecciones que más resultan en terapia de artroplastias articulares totales realizadas, con una suma total de más de 168,000 artroplastias de cadera y 267,000 artroplastias de rodilla realizadas anualmente en los Estados Unidos [1]. Sólo para el año 2006, se reportaron más de 700,000 procedimientos en los Estados Unidos y se estima que esta cifra aumente a un aproximado de cuatro millones entre remplazo de prótesis de cadera y rodilla para el año 2030 [2].

El aumento en la demanda de prótesis de remplazo articular no es el único que se ha visto afectado, ya que el 69% de los adultos de 35 a 44 años han perdido al menos un diente permanente por enfermedades bucales o por accidentes, por lo que se estima que al menos tres millones de personas tan solo en EEUU tienen implantes dentales, lo cual implica una demanda creciente y continua [3]. Entre estos casos mencionados se concluye que a medida que la población aumenta su expectativa de vida, incrementan las afecciones asociadas a la edad, como patologías óseas debido al deterioro progresivo producido, por lo que las tasas de

utilización de dispositivos médicos de remplazo articular y dental han crecido y lo seguirán haciendo. Los grupos de edad avanzada (hasta los 79 años) son quienes más necesitarán la utilización de estos dispositivos biomédicos, según los datos estadísticos que se han obtenido únicamente en EEUU [3].

Por otra parte, cabe mencionar que las complicaciones relacionadas a las prótesis o biomateriales están presentes en casi el 10% de los casos de Estados Unidos, en donde las infecciones alrededor de estos implantes (infecciones articulares prostéticas) son un grave problema para la salud del paciente y su rehabilitación. Este hecho implica un gran costo para el sistema de salud pública, incluso considerando que sólo un pequeño porcentaje de las artroplastias termina en infección (entre 0.8% y 1.9% para rodilla y entre 0.3% y 1.7% para cadera). Por lo tanto, existe una gran relevancia en estos porcentajes, pues el costo de un implante en sí mismo suele constituir una pequeña fracción del costo total del tratamiento por infecciones asociadas a implantes. Se estima que el tratar la infección de una prótesis de cadera cuesta aproximadamente cinco veces lo que una prótesis sana [3]. Otro factor a considerar (ya que puede ocasionar problemas para la aceptación del implante) es la flora bacteriana misma del cuerpo y el medio circundante, ya que tienen la capacidad de desencadenar una infección, rechazo de la prótesis e incluso necrosis. Cerca de la mitad de los dos millones de casos de infecciones nosocomiales que ocurren cada año en los Estados Unidos, los dispositivos permanentes pertenecen al grupo afectado por dichas infecciones, aunque son menos comunes que las infecciones asociadas con los catéteres. Además, las infecciones asociadas a los implantes quirúrgicos son más difíciles de manejar, ya que requieren un periodo más prolongado de terapia con antibióticos y procedimientos quirúrgicos repetitivos [5]. Los patógenos capaces de desencadenar las infecciones nosocomiales son numerosos, de entre los

que destacan *Escherichia coli* (*E. coli*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*), *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*), entre otros. Aunque los patógenos comúnmente asociados a las infecciones relacionadas con implantes son *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* (*S. aureus*, *S. epidermidis*), se sabe que la concentración entre bacterias y antibióticos está estrechamente relacionada a las infecciones, al igual que al tiempo de exposición y otros factores [1, 6, 7].

Las interacciones entre bacterias o células de tejido y la superficie del sustrato dependen en gran medida de la estructura atómica de la superficie y la composición de los biomateriales [6]. Debido a la capacidad de las bacterias para adherirse y propagarse en los materiales implantables, existen infecciones características cuyo diagnóstico no es favorecedor, pues resulta en complicaciones quirúrgicas recurrentes y sin control. También, existen otro tipo de microorganismos que comprometen la integración del implante al cuerpo como los hongos, cuyo rastro se ha detectado en prótesis dentales extraídas debido a complicaciones y rechazo de las mismas. La aparición de este tipo de microorganismo puede ocasionar la formación de biopelículas polimicrobianas que pueden concluir con la pérdida del implante y necrosis del tejido circundante [6]. Por todo lo anterior, podemos entender la forma en que un implante metálico puede ser rechazado por el cuerpo, ya sea por su falta de biocompatibilidad con el medio biológico o por la proliferación de microorganismos patógenos en el implante, que, aunque sean escenarios distintos, tienen un factor en común que juega un papel fundamental: **la superficie del biomaterial y su interacción con el medio**. Hechos que formulan la hipótesis (de este trabajo de tesis) de que la modificación de la superficie del biomaterial puede lograr la

inhibición de microorganismos patógenos y además añadirle las características suficientes para lograr que este sea bioactivo.

Hoy en día el estudio y desarrollo de nuevos biomateriales es una carrera emergente beneficiada a la par de los nuevos conocimientos de la ciencia de los materiales. Una de las grandes aportaciones de los avances de esta disciplina es el diseño de materiales con aplicaciones médicas, que tienen como base el emular la estructura y morfología de los materiales biológicos, a lo que también se está incluyendo la modificación de la superficie de las prótesis metálicas, específicamente las que se emplean para la ortopedia o dentales, para disminuir la adherencia bacteriana con el objetivo de evitar complicaciones médicas y contribuir a la recuperación y aceptación de la prótesis en cada caso. Es importante estudiar las formas en que un biomaterial como las aleaciones de titanio (Ti) pueden ser modificados superficialmente para adecuarlos a las exigencias y necesidades clínicas. Se busca que las nuevas modificaciones en biomateriales logren evitar la adherencia bacteriana y la tendencia de los microorganismos a crear biopelículas en la superficie de esta clase de dispositivos médicos, de esta forma, se puede reducir significativamente las complicaciones médicas asociadas a ellos.

La síntesis de nuevos materiales diseñados con elementos que promueven la biocompatibilidad permite la construcción de prótesis con la capacidad de adaptarse al medio y de responder ante él. También contribuyen al éxito de la implantación sin complicaciones médicas, así mismo, puede ayudar a disminuir la cantidad de pacientes con problemas por implantes de prótesis, a lo que también se incluye una disminución en los costos de atención médica.

1.2 FUNDAMENTO TEÓRICO

1.2.1. Biocompatibilidad

El término biocompatibilidad puede asociarse al efecto de un material cuya naturaleza le permite interactuar con fluidos del cuerpo y tejido, en donde permanecen química y biológicamente inertes, se asocia también a la capacidad del biomaterial para no presentar indicios de corrosión, esto se traduce en que no existe una liberación de sustancias tóxicas derivadas de la corrosión que puedan dañar a los tejidos circundantes.

La biocompatibilidad de un material es determinada a través del resultado de pruebas experimentales *in vitro*, en la que se considera la respuesta de una selección de cultivos celulares que determinan toxicidad celular y solubilidad de las aleaciones utilizadas (hablando de implantes metálicos). La biocompatibilidad es uno de los factores clave para el éxito de un dispositivo médico destinado a ser implantado [8].

1.2.2. Definición

La versión actual de la primera definición de biocompatibilidad aceptada en la conferencia de Chester de la European Society for Biomaterials en 1987 es:

“Habilidad de un biomaterial para llevar a cabo una función deseable con respecto a una terapia médica, sin producir efectos indeseables locales o sistémicos en el recipiente o beneficiario de esta terapia, generando una respuesta celular o tisular apropiadamente benéfica en una situación específica y optimizando el rendimiento clínicamente para esta terapia” [8].

1.2.3. Biomateriales

En lo que se refiere a su aplicación médica, los biomateriales han ido desempeñando un papel fundamental para la calidad de vida del paciente, sobre todo por sus características y su capacidad de interactuar con el sistema biológico, dando mayor certidumbre de que el implante cumpla con su función sin complicaciones.

Hoy en día las exigencias de un biomaterial han cambiado, pues antes únicamente se buscaba materiales inertes cuya reacción en el organismo fuese mínima y su elaboración no tenía el rigor que requiere el diseño de una prótesis moderna, sino que sólo se buscaba que remplazaran o restauraran alguna función. Además, que se buscaba que su interacción con el medio al ser implantados no generase toxicidad en el cuerpo a diferencia de los materiales que se trabajan en el momento que contemplan una mejor integración al organismo y un desempeño superior que implica mayor seguridad para el paciente que recibe el implante o prótesis. Un material bioactivo es aquel que se integra con las moléculas biológicas o células y contribuye a la regeneración de tejido o que tenga la capacidad de responder frente a ciertas señales provenientes del medio fisiológico induciendo una respuesta específica del tejido biológico circundante.

1.2.4. Definición

En septiembre de 1991 la Sociedad Europea de Biomateriales (European Society for Biomaterials- ESB), definió la palabra biomaterial para aquellos materiales que se emplean para evaluar, tratar, corregir o reemplazar cualquier tejido u órgano en el cuerpo humano [8].

De estos se derivan diferentes tipos de materiales tales como; cerámicos, polímeros y metales. Considerando este último como principal opción para prótesis dentales o de cadera por sus características, fisicoquímicas, mecánicas y de biocompatibilidad.

1.2.5. Clasificación de los biomateriales

El enfoque de los nuevos biomateriales se basa en dos principales objetivos; el primero es desarrollar implantes con la propiedad de imitar la funcionalidad del órgano que se busca reemplazar. El segundo es producir un material capaz de promover el crecimiento de tejido, brindar soporte y que a la vez sea reabsorbido conforme se obtenga el crecimiento requerido.

A pesar de lo anteriormente mencionado, todo material que se implante en el cuerpo genera una reacción ya que no hay material completamente inerte [8], partiendo de la existencia de dicha reacción podemos encontrar las siguientes clasificaciones, siendo las más relevantes para este protocolo de investigación.

No tóxico y biológicamente inactivo:

También llamados inertes, debido a que la reacción que generan es mínima y no afecta el propósito del mismo, estos materiales al ser implantados en el cuerpo provocan un proceso de formación de encapsulamiento de tejido fibroso no adherente de grosor variable. Esta reacción de encapsulamiento se asocia a una respuesta de protección cuyo fin es aislar el implante del tejido circundante [9]. Los metales se pueden clasificar dentro de este tipo de materiales, es decir, son casi inertes. Diferentes estudios muestran que en el Ti y sus diferentes aleaciones utilizadas para implantes, la respuesta de la capa fibrosa que se forma es usualmente muy delgada, mientras el espesor de la cápsula que recubre al material sea mayor es más

probable que existan complicaciones con el implante, desde que pierda fijación hasta provocar fractura en el hueso en la región adyacente del implante.

No tóxico y bioactivo:

Un material biológicamente activo permite una reacción química controlada de acuerdo con el tiempo para favorecer algún proceso biológico con el fin de imitar la regeneración de tejido o autoreparación [9].

La tendencia para la nueva generación de biomateriales es que, aunado a estas características de clasificación, se tienda a modificar la superficie del material sin provocar respuesta inflamatoria descontrolada luego de su implantación, es decir, que posea baja reactividad negativa con el medio biológico circundante. Se sabe que el Ti es un material capaz de integrarse, ya que presenta una superficie apta para la adherencia y el crecimiento del hueso y otros tejidos, formando un excelente anclaje. Por ejemplo, las superficies de óxido de los implantes de Ti se recubren de una capa de otro material (formando materiales compuestos), que se reemplaza por haces de fibrillas y fibras de colágeno las cuales se unen a las del hueso circundante, produciendo la osteointegración. Se sabe que el Ti y sus aleaciones consiguen formar una interface equivalente a la osteointegración en los implantes clínicos [10,11,12].

De acuerdo con las características del Ti y sus aleaciones, este material puede ser candidato para el desarrollo de nuevos biomateriales con las especificaciones clínicas de necesidad actual, es decir buscar la forma en que un biomaterial pueda ser bioactivo y funcional.

1.2.6 Titanio y sus aleaciones utilizado para biomateriales

Desde el punto de vista mecánico, el Ti se destaca por su alta resistencia, comparada con otros materiales como los polímeros y los cerámicos. En general el Ti reúne características

mecánicas, físicas y propiedades químicas que influyen en su baja densidad, que le permite presentar resistencia a la corrosión y biocompatibilidad. Debido a esto, es uno de los principales materiales (junto con sus aleaciones) utilizados para el diseño e implementación de prótesis articulares, placas de osteosíntesis, tornillos de fijación e implantes dentales, entre otras (Figura 1.1).

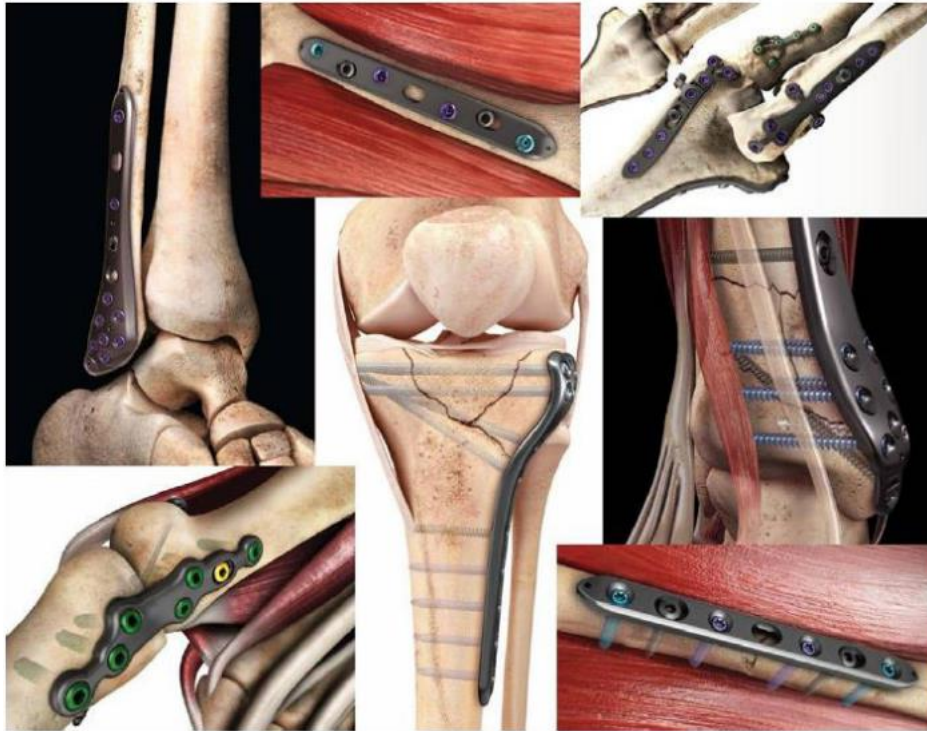


Figura 1.1: Representación esquemática de la fijación de fragmentos óseos mediante, tornillos y placas metálicas [39].

Una de las cualidades más importantes del Ti y sus aleaciones es su biocompatibilidad, y su alta resistencia a la corrosión generada por los fluidos del cuerpo humano. Cuando ocurre deterioro del biomaterial, puede provocar la disminución de la resistencia mecánica y, por consiguiente, fallas en la unión material-estructura ósea. El fallo de un implante puede resultar en un ambiente apto para el crecimiento bacteriano y por ende contaminar, esto lleva a que inicien procesos de reacción que terminan en el rechazo y la necesidad de realizar

intervenciones quirúrgicas para retirar los elementos del implante o elementos de osteosíntesis defectuosos.

Al igual que otros elementos metálicos como: calcio (Ca), hierro (Fe), cobalto (Co), zirconio (Zr), estaño (Sn), cerio (Ce), etc. El Ti puede cristalizarse en diferentes estructuras cristalinas, aunque cada modificación es estable solo dentro de rangos de temperatura particulares. La transformación alotrópica se refiere a la transformación completa de una estructura en otra estructura cristalina y la temperatura específica que permite esta transformación se denomina temperatura transus [41]. El titanio puro, a bajas temperaturas presenta una estructura hexagonal compacta (fase α), sin embargo, a altas temperaturas, la estructura estable pasa a ser cúbica centrada en el cuerpo, es decir se encuentra en fase β . La temperatura beta transus es aproximadamente de 882 °C, estas diferentes estructuras permiten que el titanio tenga una amplia variedad de propiedades debido a las aleaciones, ya que se combinan transformaciones de fase con diferentes microestructuras [13, 35].

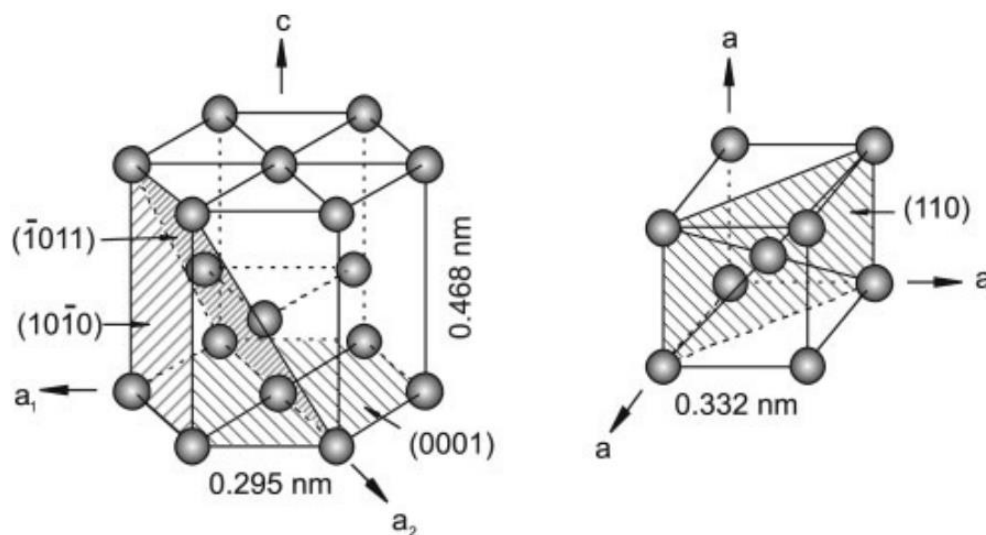


Figura 1. 2: Las imágenes muestran las dos posibles estructuras del titanio, la imagen de la izquierda representa la estructura hexagonal compacta (fase α). De lado derecho se observa la estructura cúbica centrada en el cuerpo (fase β) [41].

La temperatura de transformación alotrópica del Ti está relacionada a la variedad de los elementos aleantes, los cuales podemos dividir en tres categorías. Los elementos de aleación α -estabilizantes (promueve la transición a fase alfa), β -estabilizantes (promueve la transición a fase beta) y elementos neutros. Se podría afirmar que uno de los parámetros más importantes en el diseño de dispositivos biomédicos metálicos es su biocompatibilidad, como ya se había mencionado antes, esta biocompatibilidad está en función de la selección y composición de los elementos aleantes, los elementos de aleación que se combinan con el Ti provocan un cambio de temperatura de transformación. Algunas de las aleaciones elegidas son el aluminio (Al) este elemento funciona como α -estabilizante y es muy utilizado en las aplicaciones biomédicas. La temperatura alotrópica incrementa a medida que su concentración como soluto aumenta en la aleación de titanio, este elemento presenta solubilidad tanto en la fase alfa como en la fase beta. Otros elementos de aleación son el Molibdeno (Mo), Vanadio (V), Niobio (Nb) y Tantalio (Ta). Estos elementos se clasifican como betas estabilizantes, su particularidad es que tienen la capacidad de estabilizar la fase beta a temperatura ambiente con la cantidad necesaria de cada elemento [40]. Aunque existe esta selección de elementos aleantes, pueden utilizarse los elementos que están presentes en el cuerpo humano, sobre todo pensando en el diseño de implantes metálicos. En las investigaciones biomédicas destaca la selección de estos elementos no tóxicos de los cuales además de los antes mencionados son: Zirconio (Zr), Estaño (Sn) etc. Elementos que consideran neutros [35, 36, 37].

La aleación Ti-6Al-4V es una de las más utilizadas para el diseño de implantes ya que presenta características favorables para la integración al cuerpo humano de entre las que destacan: baja densidad, alta resistencia a la corrosión y al desgaste, alta biocompatibilidad, resistencia a la fatiga y una buena estabilidad química además de un módulo de Young relativamente bajo. [41, 42].

1.2.7. Rechazo de implantes metálicos

La introducción de cualquier material no compatible al cuerpo produce una reacción de rechazo, que se manifiesta como irritación moderada, inflamación o puede escalar incluso hasta la muerte, por lo que cualquier material implantado debe ser biocompatible, es decir, que provoque un mínimo o nulo grado de rechazo. Los productos que se forman por la interacción del material y los fluidos corporales deben ser tolerados por los tejidos circundantes y sus funciones no se deben interrumpir [13]. Para que la integración del implante en el cuerpo sea exitosa debe ocurrir la biocompatibilidad, la cual puede verse afectada por diferentes factores y fenómenos. La literatura habla acerca de la película que recubre al material como respuesta inmune, la calidad de dicha capa que recubre al material depende de los fluidos circundantes del medio corporal, por ejemplo, saliva, fluido tisular, sangre, etc. Por lo que el lugar del implante también juega un papel importante, ya que el biofluido circundante acondiciona el implante. Se sabe que no existe biomaterial completamente inerte [13] y las características de los materiales metálicos en un medio biológico húmedo, cálido y oxigenado puede llegar a provocar corrosión, es decir liberación de iones metálicos, capaces de ocasionar una respuesta alérgica. También, puede ocurrir una sobreestimulación de macrófagos o fagocitos en el área del implante, lo que sugiere un rechazo, la presencia de linfocitos sugiere una respuesta inmune en contra del material y la acumulación de neutrófilos puede sugerir dos situaciones; que existe

presencia de una infección o que se está llevando a cabo la resorción de hueso y la formación de una capa fibrosa gruesa, lo que conlleva a una baja biocompatibilidad entre el hueso y el implante. Por lo tanto, la relación entre las propiedades fisicoquímicas de la superficie y la respuesta celular determinan la biocompatibilidad y bioactividad de un material [14].

De manera que, para que exista una implantación exitosa, la capa que recubre al material debe ser fina y no fibrosa, pues compromete la adhesión del implante al hueso. Otro factor importante es la respuesta celular, lo que nos lleva a la biocompatibilidad del material en el que también se incluyen otros factores como las características del paciente y cómo se llevó a cabo el procedimiento quirúrgico. A pesar de que dichos procedimientos se ejecutan bajo estrictas reglas de esterilización, las infecciones asociadas a los implantes (infecciones periprotésicas) son consideradas uno de los principales desafíos en la cirugía ortopédica [15].

1.2.8. Películas microbianas y su relación con el rechazo de prótesis

Las biopelículas pueden definirse como comunidades de microorganismos que están unidas a una superficie [16,17]. Se ha descubierto que las bacterias en conjunción pueden llegar a desarrollar características de organismos más complejos como la diferenciación. Estas biopelículas pueden ser de una sola especie o de múltiples especies, su formación se puede dar en superficies bióticas o abióticas. Las biopelículas de especies únicas se encuentran en diferentes tipos de infecciones y en la superficie de implantes médicos [17]. Investigaciones recientes demuestran que los hongos como *Candida albicans* también son capaces de formar biopelículas en implantes médicos. Ha pasado desapercibido a nivel clínico la capacidad de los hongos de formar biopelículas, sin embargo, en procedimientos como trasplantes, el uso de dispositivos crónicos permanentes y las estancias prolongadas en la unidad de cuidados intensivos, ha provocado el aumento y la prevalencia de enfermedades fúngicas, las especies

que más destacan son el género *Candida*, que pueden llegar a causar enfermedades tanto superficiales como sistémicas. La mortalidad de los pacientes con candidiasis invasiva puede llegar hasta a un 43%. La Candidiasis generalmente se asocia con dispositivos médicos permanentes, por ejemplo, implantes dentales, catéteres, válvulas cardíacas, injertos de derivación vascular, lentes oculares, articulaciones artificiales y derivaciones del sistema nervioso central. La inmensa capacidad con la que *C. albicans* infecta dispositivos médicos permanentes, y su naturaleza de propagarse y ser resistentes a los fármacos antimicrobianos, da paso a la necesidad de nuevos elementos que permitan su inhibición [18].

Actualmente ha crecido el interés por el papel que desarrollan las biopelículas microbianas en las enfermedades infecciosas, pues el Instituto Nacional de Salud estima que el 80% de las infecciones humanas son el resultado de biopelículas patógenas, por lo que representan un problema de salud poco estudiado y clínicamente relevante, pues dichas biopelículas tienen la capacidad de servir como reservorio infeccioso para una variedad de microorganismos, incluidas bacterias y hongos, por lo que es difícil de diagnosticar y tratar [19, 20].

El proceso de formación de biopelícula microbiana es el siguiente:

- 1.- Adhesión al sustrato (biomaterial).
- 2.- Proliferación y formación de grupos de células bacterianas sobre la superficie del material.
- 3.- Formación de masa de células bacterianas junto con su material extracelular (limo: exopolisacáridos, glicoproteínas, glicolípidos, etc.) a este proceso se le conoce como biopelícula.

4.- Las células bacterianas adheridas en exceso tienden a separarse de la capa de limo y formar una nueva colonia en otro lugar del biomaterial como se observa en la *Figura 1.3* [21,22,23].

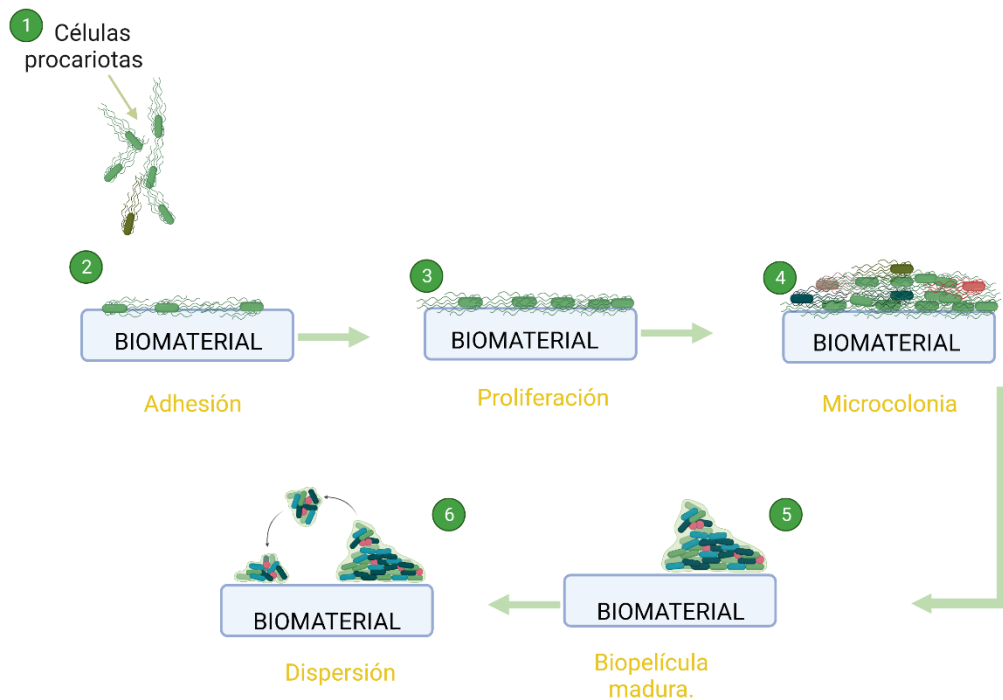


Figura 1.3: Representación esquemática de la formación de biopelículas. El proceso comienza con la adhesión reversible de las células procariotas a una superficie (biomaterial). (1). Las bacterias comienzan proliferar sobre la superficie del material (2) Comienza a formarse una monocapa y una unión irreversible mediante la producción de una matriz extracelular (limo) (3). Posteriormente aparece una microcolonia que da lugar a una multicapa (4). Durante las últimas etapas, la biopelícula madura forma estructuras debido a los polisacáridos (5). El último paso consiste en la dispersión de algunas células de la biopelícula para poblar más área de la superficie (6). Esta imagen fue creada en BioRender.com.

Sólo se puede acumular un número limitado de bacterias en una biopelícula establecida [23,24]. Se ha reportado que algunas cepas bacterianas que no producen limo se encuentran

comparativamente menos adherentes y, por lo tanto, menos dañinas para los humanos [25,26]. Las capas delgadas formadas por limo funcionan como un escudo para las bacterias, ya que les protege de la fagocitosis, los efectos de los antibióticos y las condiciones de alto flujo, de manera que el sistema inmunológico puede matar fácilmente las bacterias que son menos susceptibles a la adhesión en la superficie. Muchas bacterias generadoras de limo pueden desarrollar resistencia a los antibióticos después de haberse adherido a la superficie del sustrato. El inicio de la infección prostética se produce cuando una población bacteriana derrota el sistema de defensa local del huésped [27, 28, 29]. Por otra parte, las interacciones fisicoquímicas entre bacterias y la superficie del material juegan un papel importante; la adsorción y la unión son los pasos principales para la adhesión bacteriana a la superficie. Generalmente, las células bacterianas eligen superficies sólidas sobre las cuales proliferar en lugar de algún medio líquido de crecimiento circundante, las bacterias se adhieren a la superficie del biomaterial a través de interacciones físicas, como las interacciones de largo alcance (no específicas, distancia > 50 nm) y las de corto alcance (distancias < 5nm), siendo estas últimas las más efectivas para lograr la adhesión. Después de esta unión inicial, las bacterias forman enlaces químicos con las proteínas de la superficie [29, 30, 31, 32]. Luego de las interacciones fisicoquímicas entre bacterias y superficies de biomateriales, las reacciones moleculares específicas se vuelven predominantes para la adhesión.

La adhesión bacteriana en la superficie del biomaterial se vuelve más fuerte por la función de puente selectivo de las cápsulas, fimbrias y mucosidad. Las bacterias tienen hebras de polisacáridos que median la unión hacia distintos puntos de la superficie del biomaterial, además, las bacterias tienen diferentes tipos de proteínas de superficie [32, 33]. La adhesión bacteriana es un proceso extremadamente complicado que se ve afectado por muchos factores,

incluidos el entorno de cultivo, la composición química de la superficie, la rugosidad de la superficie y las características bacterianas. Mencionando brevemente los factores ambientales que afectan la adherencia bacteriana son: temperatura, la concentración bacteriana en el medio de crecimiento, la concentración de antibióticos (de estar presentes) y las condiciones de flujo asociadas [9]. Las condiciones de flujo afectan en gran medida a la población bacteriana que se ha adherido, de esta misma forma también se ve afectado la disposición y el rendimiento de la biopelícula [34].

Como lo sugiere la bibliografía consultada, es de sumo interés encontrar métodos que permitan la inhibición de crecimiento microbiano y su capacidad de formar biopelículas en la superficie de materiales implantados, pues estos microorganismos comprometen el tratamiento clínico y pueden provocar la pérdida de implantes y complicaciones más serias.

CAPÍTULO 2 PLANIFICACIÓN Y OBJETIVOS

2.1. ESTRATEGIAS METODOLÓGICAS Y PLANIFICACIÓN DEL PROYECTO

En este capítulo se plantean las fases de la planificación para llevar a cabo el proyecto, el objetivo general y los específicos.

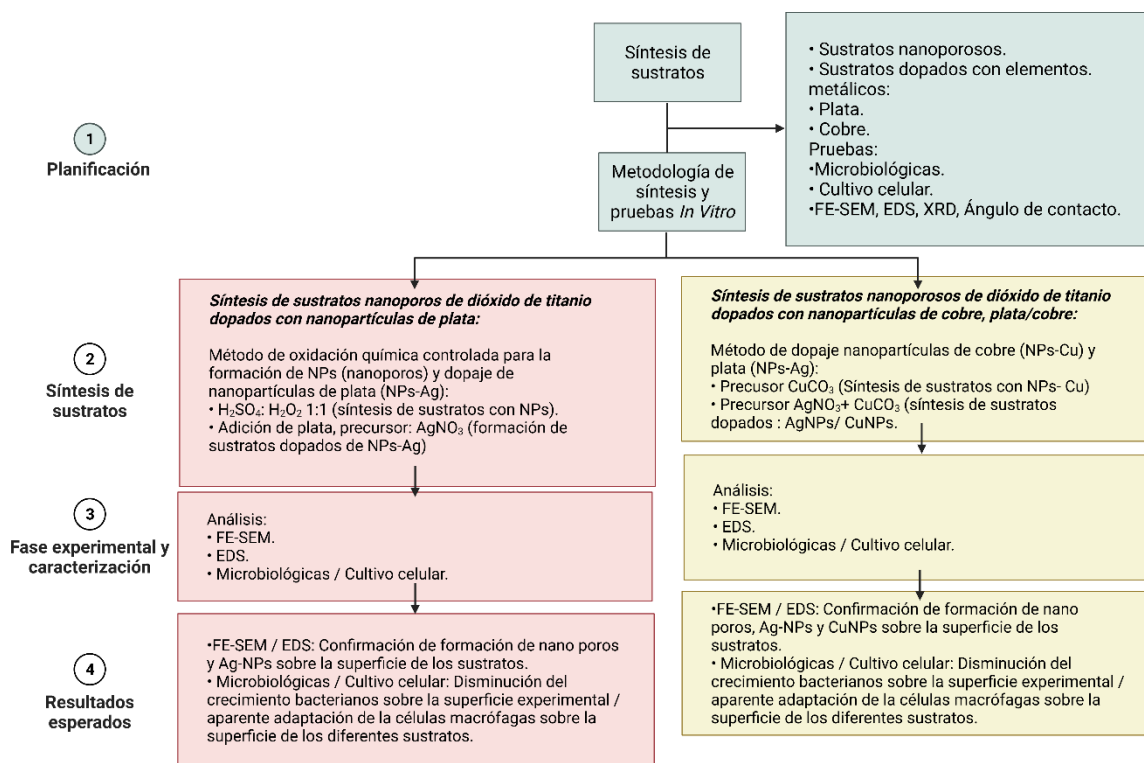


Figura 2.1. Esquema de planificación y fases del proyecto. Esta imagen fue creada en: BioRender.com.

2.2. OBJETIVO GENERAL

Sintetizar nanoporos de dióxido de titanio (TiO₂) dopados con plata (Ag) y cobre (Cu) a través de métodos químicos para proponer un nuevo biomaterial con potente capacidad antimicrobiana, con perspectiva a ser implementado como una nueva opción de biomaterial.

2.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Formular la solución de síntesis que promueva la mayor inhibición microbiana con configuración de nanoporos.
2. Caracterizar las configuraciones morfológicas de las superficies experimentales a través de un análisis de microscopía (microscopio electrónico de barrido emisión de campo).
3. Cuantificar el diámetro de los nanoporos con el software Image J (1.48v, NIH, EE. UU.).
4. Realizar análisis químicos de superficies por espectroscopia de dispersión de rayos X (EDX).
5. Realizar análisis de difracción de rayos X (XRD).
6. Realizar ensayos de adhesión y colonización microbiana (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterica*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*) en la superficie del material.
7. Determinar la viabilidad celular (MTT) modelo célula inmune RAW 264.7.

CAPÍTULO 3

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

3.1. INTRODUCCIÓN

En este capítulo se presenta la metodología para la síntesis de cuatro sustratos de nanoporos de TiO₂ (NPs) con características particulares: sustrato de NPs, sustrato de NPs dopado de Ag, NPs dopado de Cu, y sustrato de NPs dopado de Ag y Cu. Se explica a detalle la caracterización de dichos materiales por técnicas microbiológicas, ingeniería de tejidos, y la preparación para análisis de microscopía electrónica de barrido y ángulo de contacto.

El objetivo del desarrollo de las metodologías mencionadas es contribuir con la generación de nuevos conocimientos que permitan lograr la síntesis de biomateriales con propiedades bioactivas, tendencia actual (y a futuro) para el desarrollo e implementación de estos. Dicha tendencia está motivada por la necesidad de ofrecer implantes que emulen de forma más cercana a los materiales biológicos y puedan adaptarse mejor al cuerpo humano, evitando el rechazo de los mismos. Para la preparación de muestras de NPs se eligió la técnica de oxidación química controlada ya que dicho método es de bajo coste y con resultados altamente eficientes, que cubren las necesidades establecidas para la formación de biomateriales de nueva generación.

Para la implementación de elementos metálicos en la superficie de los especímenes (plata y cobre), se utilizó un método químico para integrar la plata al material, y para el cobre se optó por un método de horneado. Para la evaluación de dichos sustratos, y la comprobación de su capacidad bactericida reproducible, se sintetizaron muestras de cada tratamiento para hacer un estudio por triplicado y se incubaron por un periodo de tiempo determinado con microorganismos patógenos asociados al rechazo de prótesis. Este estudio se llevó a cabo con ocho microorganismos

patógenos clasificados como Gram positivos y Gram negativos, vinculados a enfermedades nosocomiales.

Adicionalmente se realizaron pruebas con células mamíferas (involucradas en la aceptación de implantes), para determinar si el material propiciaba una mejor adaptación, proliferación y maduración.

3.2. PREPARACIÓN DE LOS SUSTRATOS DE TITANIO PARA LA FORMACIÓN DE MESOPOROS Y NANOPOROS:

La elección de oxidación química controlada para la obtención de nanoporos homogéneos con diámetros reproducibles mediante reacciones de oxidación química es una de las metodologías menos costosas, el procedimiento comienza formulando (para este estudio en particular) una mezcla 1:1 de H_2SO_4 concentrado y H_2O_2 . Se comprobó que al introducir las piezas de Ti6Al4V (1 cm x 1cm) seleccionadas para grabado químico se obtuvieron mesoporos de tamaños entre 57 y 300 nm y nanoporos de entre 10 y 30 nm. La preparación se inicia cortando piezas de una lámina delgada de Ti6Al4V (cuadros de 1cm x 1cm), después se someten a un baño de $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (etanol puro) durante 5 minutos. Una vez limpias las piezas recortadas, se colocan con pinzas quirúrgicas en cajas Petri estériles para secarse durante 24 horas.

3.2.1. Preparación de solución para grabado químico.

La solución conocida como “piraña”, utilizada para el grabado químico, se prepara cuidadosamente al incorporar dentro de una cabina de extracción (como se muestra en la *Figura 3.1*): H_2SO_4 30 N (Sigma Aldrich, St. Louis, MI, EE. UU.) y H_2O_2 acuoso al 30% (Sigma Aldrich, St. Louis, MI, EE. UU.) en relación 1:1 v/v. Para cada pieza tratada se utilizaron 5 mL de esta solución, vertida en vasos de precipitados de 10 mL: se disponen las piezas de Ti6Al4V cortadas

y lavadas en vasos de precipitado de 10 mL, una pieza en cada vaso, después de esto se prepara la campana de extracción para llevar a cabo el grabado químico. Además, se prepara una cama de hielo frío en un cristalizador, el hielo cubre las paredes de un vaso de precipitado de 40 mL, donde reposa la solución 1:1 v/v H_2SO_4 : H_2O_2 , esto debido a que al mezclarlos se produce una reacción exotérmica, por lo que la cama de hielo cumple la función de compensar el aumento de temperatura. Una vez preparada la solución se procede a acomodar dentro de los cristalizadores el vaso de precipitado de 10 mL con la pieza de Ti6Al4V, y en el interior de la campana de extracción se vierten 5mL de la solución piraña dentro del vaso de precipitado. Inmediatamente, se activa el cronómetro y se deja actuar la solución sobre la pieza de Ti6Al4V durante 60 min. Una vez pasados los 60 min, la reacción se neutraliza con agua destilada dentro de la campana. Luego de ser neutralizada la reacción, se desecha el excedente líquido del cristalizador y con pinzas quirúrgicas se toma la pieza de Ti6Al4V tratada para ser lavada con agua destilada, luego con una piseta de $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ se limpian una vez más. Este procedimiento se repite hasta obtener las piezas necesarias para cada ensayo con microorganismos, células mamíferas, ángulos de contacto y SEM (para este estudio se realizaron 56 piezas por cada tratamiento, llegando a un total de 224 piezas de Ti6Al4V 1cm x 1cm modificadas). Una vez limpias se depositan en un vaso de precipitado de 400 mL con $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ y se limpian en baño ultrasonico (Branson, Branson, MO, EE. UU.) durante 15 min. Se colocan las piezas con pinzas quirúrgicas en cajas Petri estériles, y se dejan dentro del desecador durante 24 h. Luego de las 24 h se sella la caja Petri con Parafilm y se posterga hasta la realización de experimentos en un cajón sin exposición a la luz.

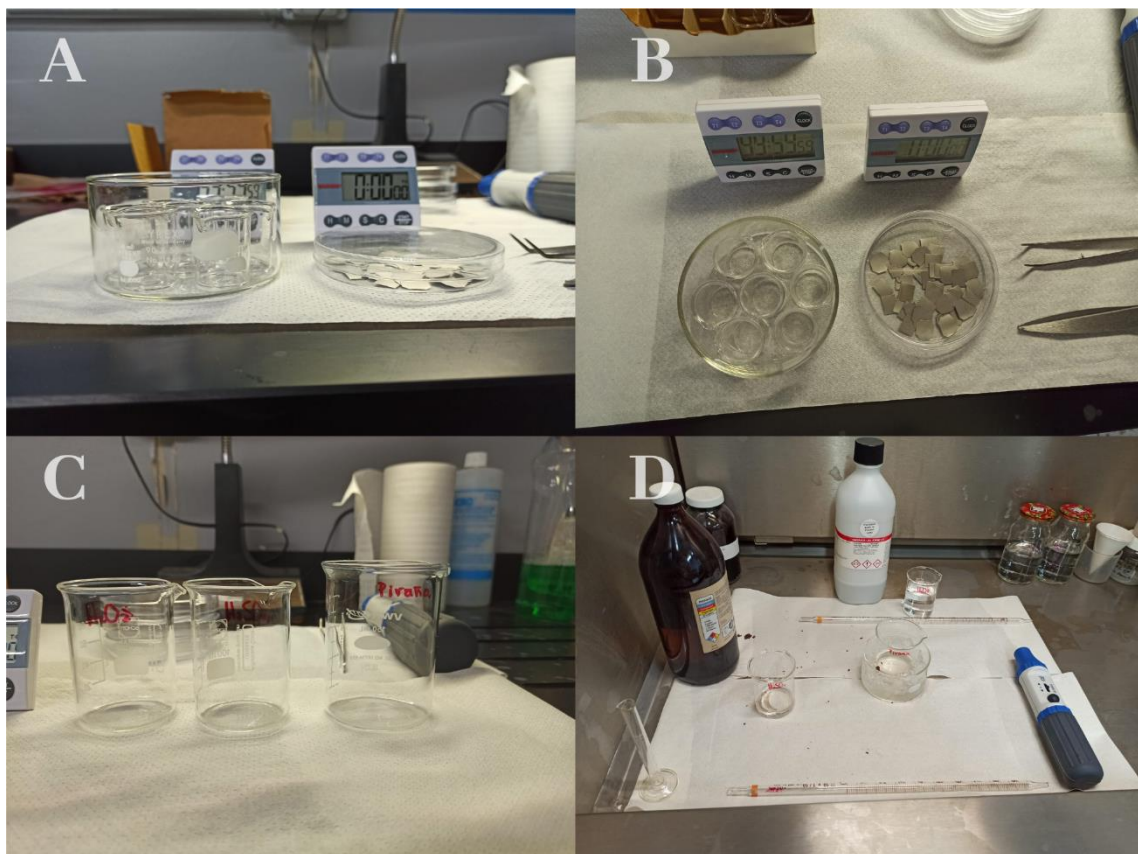


Figura 3.1: La imagen A y B muestran las piezas de titanio grado médico cortadas y lavadas, a la izquierda el cristalizador con los vasos de precipitado de 10 mL donde con pinzas quirúrgicas se colocan los especímenes a modificar, también se visualizan los cronómetros utilizados para llevar a cabo el conteo del tiempo de reacción. En la sección C y D se muestra el procedimiento para la preparación de la solución piraña, iniciando con la rotulación del material para mayor seguridad y precisión, la imagen D muestra la disposición de cada elemento dentro de la campana de extracción para llevar a cabo dicha reacción, al centro se encuentra el cristalizador con hielo y el vaso de precipitados de 140 mL, de lado izquierdo se encuentra el vaso de precipitados para el ácido sulfúrico con su respectiva pipeta, y al fondo el vaso de precipitados con peróxido de hidrógeno al 30% y su respectiva pipeta.

La solución piraña, o grabado de piraña, es una mezcla altamente oxidante, de manera que permite eliminar la materia orgánica y a la vez integra grupos OH a la superficie del material lo que provoca que estas se vuelvan altamente hidrófilas, característica necesaria para la función de un metal como biomaterial. Además, como lo dice su nombre, permite un grabado en la superficie, lo cual implica la generación de nanoporos, otra característica fundamental para el diseño de este biomaterial.

3.3. PREPARACIÓN DE LOS SUSTRATOS DE DIÓXIDO DE TITANIO NANOPOROSOS DOPADOS DE PLATA.

Para esta parte del procedimiento es necesario contar con superficies de NPs antes de comenzar con la metodología de dopado de Ag a la superficie de las mismas. Para dopar la Ag a la superficie de las muestras de Ti6Al4V se prepara una mezcla acuosa de AgNO₃ (precursor) (Sigma Aldrich, St. Louis, MI, EE. UU.) con agua destilada. Se pesan 20 mg AgNO₃ y se coloca en un tubo Eppendorf de 1.5 mL, se añade al tubo 50 µL de agua destilada obteniendo una mezcla homogénea. Cuando la pieza de Ti6Al4V está en proceso de grabado químico y una vez pasada la media hora de reacción se agregan los 50 µL de AgNO₃ acuoso y se deja actuar por 30 minutos más, luego de esto se procede a realizar el protocolo de limpieza y secado de las muestras procesadas, como se describe en el apartado anterior.

3.4. PREPARACIÓN DE LOS SUSTRATOS DE NANOPOROS DE DIÓXIDO DE TITANIO DOPADOS DE COBRE.

Para esta parte del procedimiento es necesario contar con piezas de NPs antes de comenzar con la metodología de dopado de Cu a la superficie de las mismas. Se prepara una mezcla de polisorbato 80 (Tween 80; Sigma Aldrich, St. Louis, MI, EE. UU.) y una solución de CuCO₃ en las siguientes concentraciones: a 1 mL de Tween 80 se le agrega 50 µL de CuCO₃ y agua destilada (40 mg de CuCO₃ en 50 µL de agua destilada), esta mezcla se homogeniza en vortex durante 5 minutos, estando lista la mezcla se vierte en un reactor de capacidad de 50 mL y posteriormente se acomoda la pieza a tratar en el fondo del líquido, se cierra el reactor y se coloca en horno de

convección a 100 °C durante 24 h. Después de las 24 h se retira el cilindro interno del reactor y se vierte la mezcla de Tween 80 y CuCO_3 acuoso, luego se extrae la muestra de titanio tratada y se procede a limpiar y secar como se describió en la sección 3.2.

3.5. PREPARACIÓN DE LOS SUSTRATOS DE NANOPOROS DE DIÓXIDO DE TITANIO DOPADOS DE PLATA Y COBRE.

Para la preparación de estos especímenes se realiza primero la mezcla de 20 mg de AgNO_3 en 50 μL de agua destilada en un tubo Eppendorf de 1.5 mL y otra solución de 40 mg de carbonato de cobre homogeneizado en 50 μL de agua destilada. Estas cantidades de las dos mezclas se adicionan a 2 mL de Tween 80 y se vierten dentro del reactor luego se posicionan al fondo las piezas y se recosen por 24 h, posteriormente se procede a lavar las piezas y secarlas.

3.6. PROCESO DE ESTERILIZACIÓN POR MÉTODO DE IRRADIACIÓN UV.

Todas las piezas modificadas pasaron por un procedimiento de esterilización por irradiación UV dentro de una cabina de bioseguridad (Figura 3.2). El procedimiento inicia limpiando la cabina de bioseguridad con $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ y dejando funcionar la extracción, posteriormente se limpian las cajas Petri que contienen las piezas etiquetadas (en este experimento en particular) como: NPs, Ag, Cu, Ag+Cu, por la parte exterior luego se introducen a la cabina, se destapan y con una pinza quirúrgica estéril se acomodan en filas, después se enciende la luz UV (fuente de luz UVB de 285 nm) durante 30 min. Posteriormente, se apaga la luz UV y se procede a voltear las piezas de lado contrario con pinzas estériles para irradiarse durante 30 min, terminado este procedimiento quedan listas para proceder con las pruebas microbiológicas.



Figura 3.2: En esta imagen se muestran los sustratos dentro de la cabina de bioseguridad para proceder a la esterilización por UV.

3.7. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA REALIZACIÓN DE ESTUDIO DE ÁNGULO DE CONTACTO.

Para este estudio se requiere que el material tenga una superficie mayormente plana, por ello se optó por tratar discos de Ti6Al4V pulidos y modificados. Los discos de espejo plano de Ti6Al4V con 15,0 mm de diámetro y 5 mm de espesor (ASTM F 136, Supra Alloys Inc., Camarillo, CA, EE. UU.) se pulen mecánicamente con papel de lija SiC (grano de 100 a 2000) y alúmina de 1 μm . Luego, los discos se limpian ultrasónicamente (Branson, Branson, MO, EE. UU.) durante 20 min con $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ y se desecan durante 48 h. Luego de este procedimiento, las muestras se tratan para agregarle los elementos de grabado de superficie y adición de los metales. Se procede a lavarlas y secarlas con desecador durante 24 h, después de esto las piezas están listas para realizar el estudio de ángulo de contacto. El ángulo de contacto con el agua (WCA) de superficies nanoestructuradas y planas se evalúa depositando una gota de 5 μL de agua desionizada a 25 $^\circ\text{C}$ y

45% de humedad relativa. Para obtener imágenes de alta resolución se usa un tensiómetro automatizado (Theta Attension; Biolin Scientific) equipado con una jeringa X-Y y una cámara CCD de alto rendimiento acoplada a una computadora. Los valores de WCA se obtienen utilizando el software ONE Attension, que permite un análisis muy preciso de los dos ángulos de la gota.

3.8. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA ANÁLISIS FE-SEM.

Las configuraciones morfológicas de las superficies experimentales se caracterizan con el microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FE SEM, por sus siglas en inglés) (Tescan LYRA 3, República Checa) en campos aleatorios a un voltaje de aceleración de 20 kV. Para la cuantificación del diámetro de NP se analizan al menos 3 micrografías aleatorias amplificadas a alta escala (150,000X) utilizando el software Image J (1.48v, NIH, EE. UU.).

3.9. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LAS SUPERFICIES

Las evaluaciones químicas y los análisis elementales se realizan mediante espectroscopía de energía dispersiva de rayos X (EDS) utilizando un detector de derivado de silicio (Bruker) acoplado al FE-SEM.

3.10. ANÁLISIS POR DIFRACCIÓN DE RAYOS X

Los planos cristalográficos de cada una de las superficies se analizaron por medio de un difractómetro de rayos X (Bruker Advance D8) operado con un detector de radiación Cu K α , y un intervalo de dispersión de 5 mm, un voltaje de 30kV y 30 mA. Los escaneos se realizaron de 0 a 90° utilizando un intervalo de análisis de 0.034° 2 θ .

3.11. CULTIVO CELULAR Y ENSAYOS DE INGENIERÍA DE TEJIDOS

Conocer la interacción entre los diferentes sustratos y las células involucradas en la aceptación de implantes es una tarea fundamental, por lo que se eligió la línea celular de macrófagos RAW 264.7 (ATCC, USA) para determinar si dichas células se adaptaban y proliferaban sobre la superficie. Se pudo determinar la citotoxicidad del material para las células, mediante el ensayo de reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) y la forma en que dichas células se anclan a la superficie de los sustratos, gracias a las micrografías electrónicas de barrido tomadas. El procedimiento para preparar las células para los ensayos antes mencionados se describe a continuación.

3.11.1. Procedimiento para el cultivo de células macrófagas RAW 264.7

Los macrófagos murinos RAW 264.7 se cultivaron de la siguiente manera:

Las células se extrajeron del contenedor de nitrógeno líquido para crioviales, el criovial de interés se puso a descongelar a temperatura ambiente por aproximadamente 3 minutos, cuando el contenido se descongela, se procede a verterlo en un tubo Falcon de 15 mL para centrífuga dentro de una campana de bioseguridad y cuidar la esterilidad del contenido. El tubo se centrifuga durante 10 minutos a 1200 RPM, después del tiempo de centrifugado el líquido se desecha y se conserva el pellet de células formado. A continuación, al tubo de centrífuga con el pellet celular se le adicionan 3 mL de medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI; Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, Ca, USA), enriquecido con suero bobino fetal (SBF; Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, Ca, USA) y antibiótico/antimicótico (Invitrogen, CA, USA) en las siguientes proporciones; 1% de antibiótico/antimicótico, 10% de suero bobino fetal y 89% medio RPMI. Las células con el medio completo se resuspenden para homogenizar el contenido y se coloca en una caja para cultivo celular T-25 (Corning, Tewksbury MA, USA). La caja se deja en incubación a

37° C con aire humedecido con 5% de CO₂ y cada tercer día se retira el medio viejo y se le adiciona nuevo, esto se repite hasta llegar a una confluencia celular del 80%. Cuando se llega a la confluencia deseada se procede a cosechar las células para ser utilizadas en los ensayos.

3.11.2. Procedimiento para expandir células macrófagas RAW 264.7

Al obtenerse la confluencia en las cajas de cultivo celular T-25 se procede a expandirlas en cajas Corning de 100 mm (Corning CellBIND, Tewksbury MA, USA), como se describe a continuación:

Se retira el medio viejo y se procede a realizar dos lavados con PBS 1X pH 7.26 (Buffer fosfato salino), cada lavado se realiza durante 5 minutos. El buffer se retira con ayuda de una pipeta serológica, se le adicionan 1.5 mL de tripsina/EDTA 0.25% (Gibco-invitrogen, USA) y se incuban a 37° C durante 5 minutos. Posteriormente, las células se observan al microscopio, confirmado su despegue, se procede a neutralizar el trabajo de la tripsina añadiendo 3 mL de medio RPMI completo, posteriormente se vierte en tubo cónico de 15 mL para pasarlo a centrifugar durante 10 minutos a 1200 RPM. Una vez centrifugado se observa que se haya formado el pellet de células, y se retira el contenido líquido, para agregarle 4 mL medio nuevo enriquecido (RPMI), el contenido se resuspende y en cada caja nueva de cultivo se le agregan 8 mL de medio RPMI complementado, se siembra en cada caja alrededor de 150,000 células, las cajas se incuban a 37° C, 5% CO₂, hasta obtener un 80% de confluencia. El cambio de medio se realiza cada tercer día hasta que el cultivo esté listo.

3.11.3. Ensayo de proliferación de macrófagos

Para la realización de este ensayo se colocan los sustratos esterilizados en cajas de 24 pozos (Corning, Tewksbury MA, USA), posteriormente se siembran 1.5×10^4 células/mL en cada uno de los diferentes especímenes y se incuban por 24 h, después del periodo de incubación, se retira el medio de cultivo con sumo cuidado para evitar despegar la monocapa de células formada, se lava cada sustrato con PBS 1X pH:7.26 durante 5 min, tres veces. Se retira el PBS del último lavado y a cada pozo se le adicionan 250 μ L de MTT (5 mg/mL: Sigma-Aldrich, USA) al 10% con medio RPMI. Posteriormente, se deja incubar por 3 h a 37° C, después, se retira el MTT y se le agrega a cada pozo 250 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO; Sigma- Aldrich, USA), a cada uno de pozos con las muestras. A continuación, se incuba a 37 °C con agitación durante 20 min, para disolver los cristales formados, una vez que terminó el tiempo de incubación se toman 100 μ L de cada muestra y se posicionan en una caja de poliestireno de 96 pozos estéril y se realiza la lectura de la densidad óptica del contenido con la ayuda de un lector ELISA (Thermoskan, Thermo Fisher Scientific, USA). Finalmente se analizan los datos y se grafican.

3.11.4. Preparación de las muestras con macrófagos para análisis FE-SEM.

Para este procedimiento se requiere una muestra esterilizada por UV de cada sustrato, las muestras se disponen en pozos de caja de poliestireno de 24 pozos estéril, sobre cada pieza se siembran 1.5×10^4 células/mL. Posteriormente se incuban a 37°C durante 24 h. Concluido el tiempo de incubación cada pieza se lava con PBS 1X durante 5 min por tres ocasiones. Se retira el contenido del último lavado y las piezas se fijan durante 24 horas con glutaraldehído (Sigma-Aldrich, USA) al 4% v/v en PBS. Terminado el tiempo de fijación se lavan tres veces las piezas con PBS 1X durante 15 min por cada lavado, se retira el contenido del último lavado y se procede a fijar las piezas nuevamente por 4 h. Finalmente, se vuelven a lavar las piezas con PBS1X, 3 veces durante 5 min, terminado el proceso de lavado se implementa el proceso de deshidratación

superficial para cada muestra en soluciones seriadas de etanol a diferentes concentraciones (50, 70, 90, 100) por 30 minutos cada dilución, para concluir las piezas se llevan a desecar durante 24 h.

3.12. ENSAYO DE ADHESIÓN Y PROLIFERACIÓN DE MICROORGANISMOS SOBRE LAS SUPERFICIES TRATADAS.

Para este ensayo se evaluaron ocho diferentes microorganismos patógenos, Gram positivos: *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*, ATCC 25923), *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA, por sus siglas en inglés, ATCC 33591), *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*, ATCC 12228), *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*, ATCC 29212), y Gram negativas: *Pseudomona aeruginosa* (*P. aeruginosa*, ATCC 27853), *Escherichia coli* (*E. coli*, ATCC 25922) *Salmonella enterica* (ATCC 14028), *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*, ATCC 13883). Además, se realizó este mismo estudio para determinar la viabilidad fúngica con una cepa patogénica *Candida albicans sp* aislada de paciente de 62 años diagnosticado con candidiasis bucal atrófica crónica por prótesis dental (especimen incorporado a la sepa de microorganismos disponibles para estudios del laboratorio de Biología Molecular y Cáncer del Instituto de ingeniería de UABC [43]), sobre las superficies tratadas siguiendo el mismo procedimiento, descrito a continuación.

3.12.1 Preparación del inóculo

Para la correcta preparación del inóculo se procede a realizar una resiembra en placa de agar nutritivo (BD Bioxon, México) en caso de realizar pruebas con bacterias, y en agar papa dextrosa (BD Bioxon, México) para ejecutar pruebas con hongos. Se inocula una colonia del microorganismo a tratar y se estría dentro de una campana de flujo laminar con asa microbiológica

estéril, una vez terminado este procedimiento se deja incubar la placa con el microorganismo estriado dentro de una incubadora a 37 °C durante 24 h. A continuación, dentro de la campana de flujo laminar, se preparan tubos Eppendorf con 1 mL de caldo de soya (BD Bioxon, México) en el caso de preparar inóculos de bacterias, o caldo Sabouraud Dextrosa (BD Bioxon, México) en caso de preparar inóculo de hongo. Posteriormente, se toma una colonia de la placa sembrada del día anterior con un asa estéril y se introduce en el caldo estéril, se homogeniza la mezcla colocando el tubo en un vortex, para después sellar con Parafilm e incubar durante 24 h. Después de este tiempo de incubación la muestra está lista para proceder a la segunda parte del análisis.

3.12.2 Inoculación del microorganismo sobre las superficies tratadas

Antes de proceder a la inoculación las muestras deben pasar por un proceso de esterilización con radiación UV durante 30 minutos por cada lado, como se explicó en la sección (colocar número). Finalizado el proceso de esterilización, se colocan las muestras de estudio en pozos individuales de cajas de 24 pozos estéril, las piezas se ordenaron como se muestra en la *Figura 3.3*.

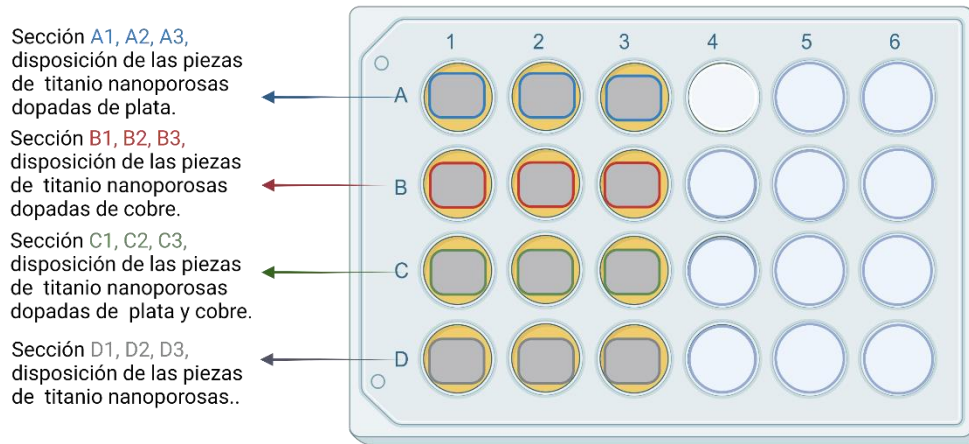


Figura 3.3: Representación esquemática del posicionamiento de las muestras tratadas para análisis microbiológico, el análisis se realiza por triplicado. Imagen creada en BioRender.com

La concentración de microorganismos para todos los ensayos se ajustó a una densidad óptica entre: 0.026-0.027. Para obtener la densidad óptica (DO) requerida, se centrifuga el inoculo (previamente incubado) a 4000 RPM durante 5 min, se retira el sobrenadante dentro de la campana de flujo laminar y se lava el pellet resultante con PBS. Durante el último lavado se retira el PBS y se coloca 1 mL de medio estéril, se toman 100 μ L y se colocan en una caja de 96 pozos (Corning, Tewksbury MA, USA) y se procede a leer la DO en un lector de ELISA. Una vez ajustada la DO, se toman 50 μ L y se coloca sobre la superficie tratada sin derramar, esto a cada uno de las muestras a evaluar, luego se incuban durante 2 horas (*Figura 3.4*). Terminado el periodo de incubación, dentro de una campana de flujo laminar se vierten 500 μ L de PBS a cada pozo durante 5 min, después de esto,

se retira el PBS y se vierte nuevamente PBS estéril, este procedimiento de lavado se realiza tres veces.

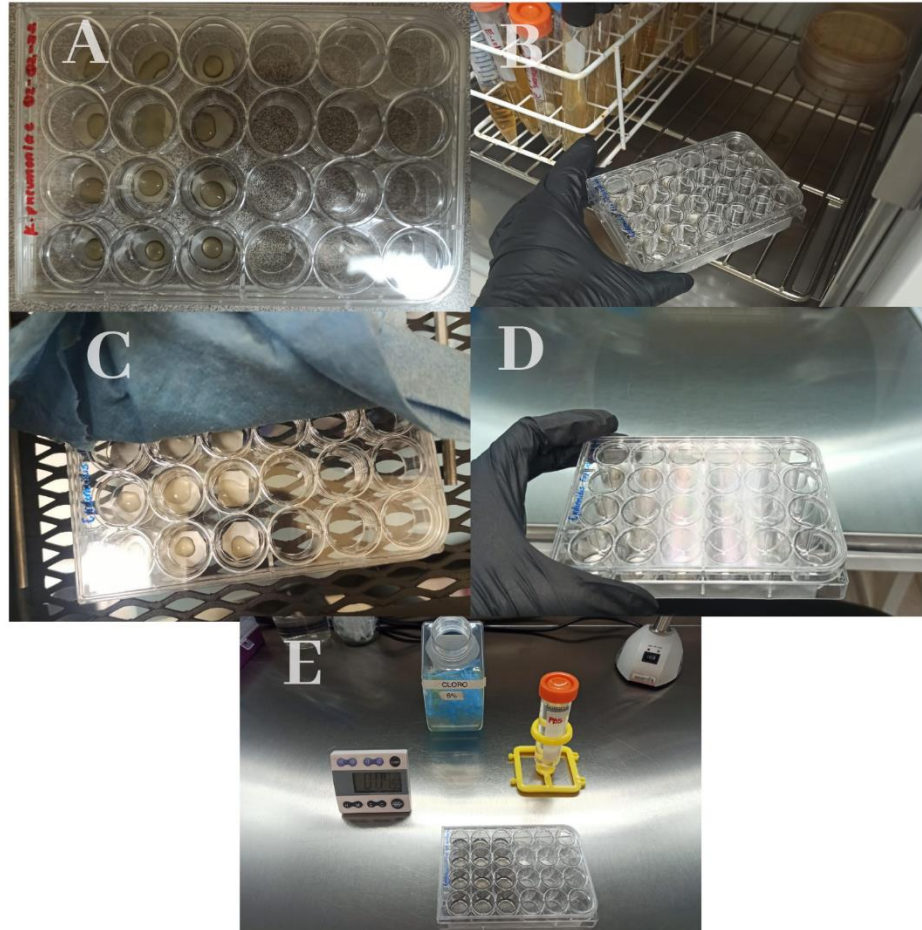


Figura 3.4: Representación fotográfica del proceso de: A; deposición de la gota de 50 μ L de microorganismo ajustado a una densidad óptica de 0.026-0.027 sobre la superficie de los sustratos. B; periodo de incubación de los sustratos con microorganismos. C; limpieza de la placa de 24 pozos con etanol (paso previo al lavado de las superficies). D; Introducción de la placa a la campana de flujo laminar. E; proceso de lavado de las superficies con PBS 1X.

Finalmente se coloca PBS una vez más y con puntas de 20 μ L estériles se raspa la superficie para despegar la biopelícula formada sobre el metal a cada muestra, después de esto se lleva a sonicar la caja con las muestras durante 1 minuto en periodos de 5 segundos. Terminado este procedimiento se realizan diluciones seriadas como muestra la *Figura 3.5*.

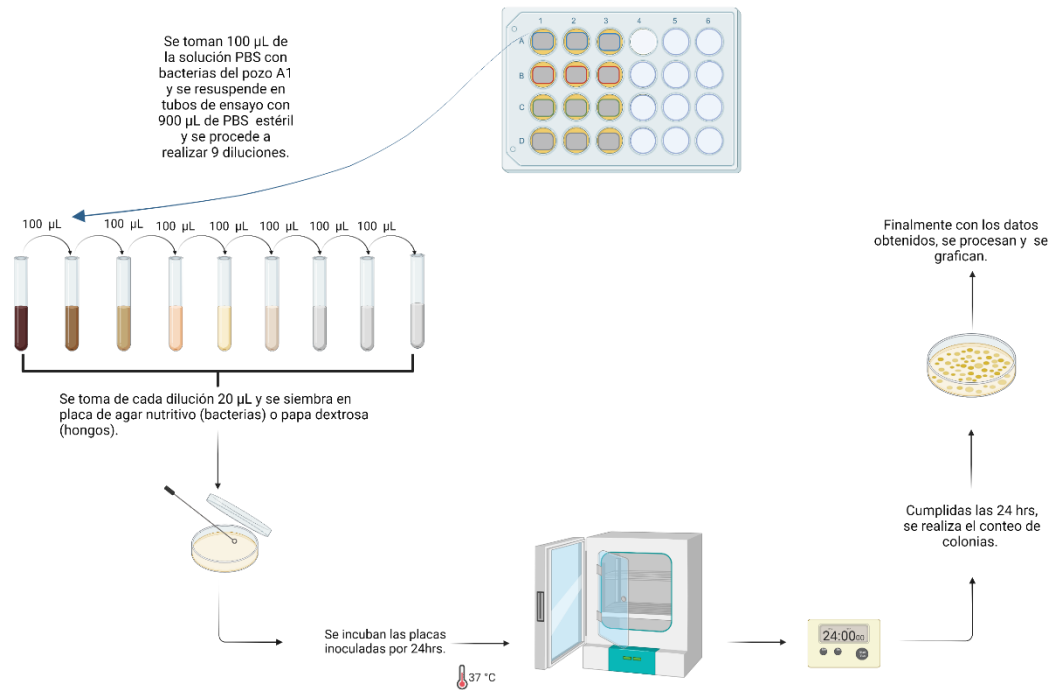


Figura 3.5: Representación esquemática del proceso para el análisis microbiológico sobre la superficie de los sustratos, esquema realizado en BioRender.com.



Para realizar el conteo en placa se toman 20 µL de cada dilución y se estrían en placas de agar, posteriormente se incuban por 24 horas, después de esto se realiza el conteo de colonias.

3.13. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La medición de los mesoporos, nanoporos y la medición de nanopartículas fue realizada con la ayuda del programa Image J (1.48v, NIH, EE. UU.) utilizando la herramienta de análisis de partículas. Los datos fueron evaluados con el programa GraphPad-Prism 8 (GraphPad Software Inc., USA) creando gráficas de distribución de frecuencias y posteriormente implementando el análisis de distribución normal, con la intención de entender la probabilidad del tamaño de

nanoporo que más comúnmente se va formar. Aunque las gráficas obtenidas no corresponden estrictamente a la forma de campana utilizada para este análisis, los resultados obtenidos son relevantes para el estudio de los sustratos modificados.

Los ensayos microbiológicos y el ensayo MTT realizados sobre la superficie de los sustratos se hicieron por triplicado, procesando los datos de conteo en placa y las lecturas de las densidades ópticas, utilizando el programa para estadística GraphPad-Prism 8. La validez de los datos se determinó implementando el método ONE WAY ANOVA (análisis de varianza).

CAPÍTULO 4

ANÁLISIS DE RESULTADOS

En este capítulo se muestran los resultados y análisis de los procesos y ensayos que se realizaron para la evaluación de los sustratos. El planteamiento para la evaluación de los sustratos se enfocó en comprobar (principalmente) si se podía lograr un recubrimiento con los metales plata y cobre seleccionados sobre la superficie de los sustratos de Ti grado cinco, y comprender qué mecanismos llevaban al dopaje de dichos elementos. Adicionalmente, poder caracterizar la morfología superficial del material esperada por el tratamiento de oxidación química controlada implementado y la cuantificación del tamaño de NPs formado por dicho tratamiento. También, se investigó la química superficial, para comprobar la presencia de los metales antes mencionados, la morfología de la superficie de los especímenes control (sustratos con NPs) y los dopados con Ag, Cu, y Ag/Cu, utilizando SEM. Para determinar la composición elemental de la superficie de las muestras, se empleó el EDS y para la composición cristalográfica se emplearon estudios de XRD. Además, se efectuaron mediciones de la capacidad de humectabilidad de cada sustrato empleando estudios de ángulo de contacto.

4.1. CARACTERIZACIÓN DE LOS MESOPOROS Y NPS

Podemos observar en la *Figura 4.1* la modificación superficial de la muestra de Ti grado médico, en esta primera parte de la caracterización morfológica del material se buscaba observar la formación de mesoporos y nanoporos (NPs) a partir de la implementación del método químico y determinar si dicho método permitía una formación y distribución de mesoporos y NPs, necesaria para añadirle características a los sustratos pensados para que actúen como biomaterial.

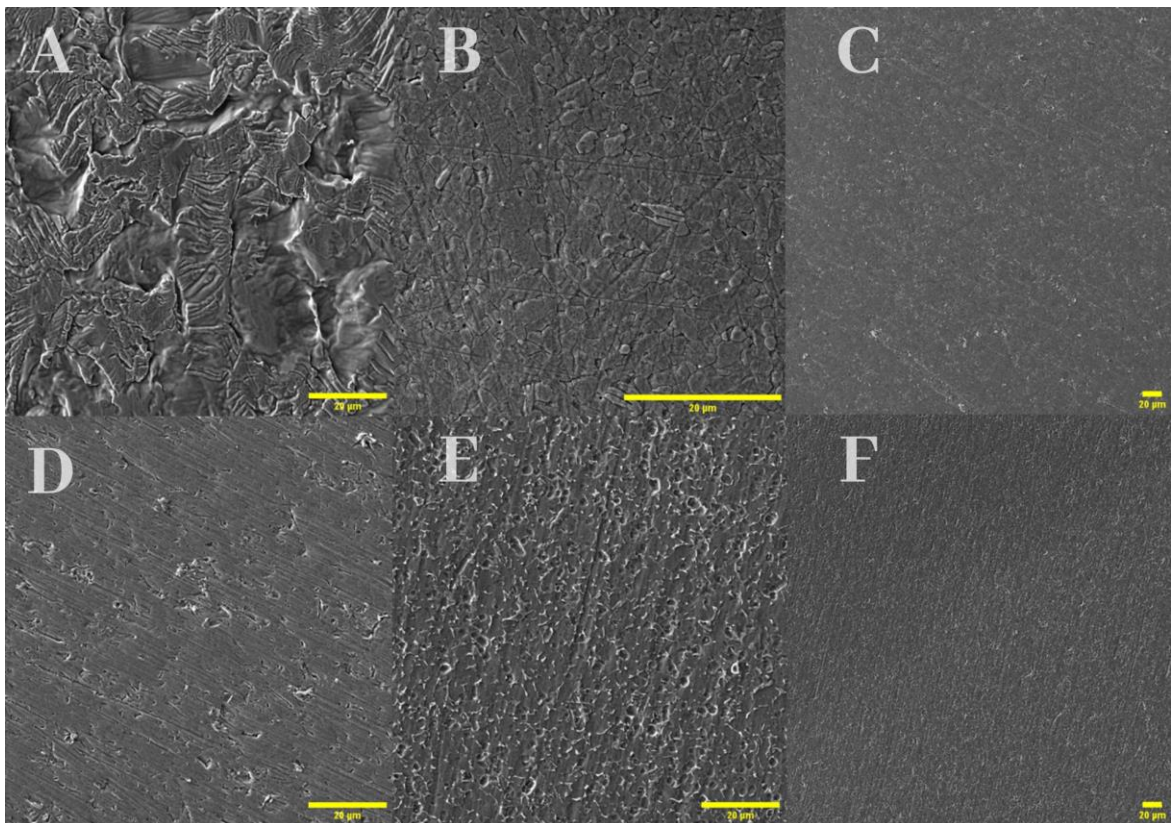


Figura 4.1: FE-SEM de baja amplificación de las superficies con mesoporos. En las micrografías A y B se observa la rugosidad formada por el tratamiento de oxidación química controlada. Por otra parte, en las micrografías C y D se puede apreciar la formación de picaduras en la superficie del material. Finalmente, las micrografías E y F muestran la distribución de estructuras mesoporosas.

Siguiendo con los análisis de caracterización se utilizó el programa Image J (1.48v, NIH, EE. UU.) para determinar el rango de tamaño de los mesoporos formados en la superficie del material, de dicho análisis se obtuvo que el tamaño de mesoporos variaba entre 13 nm (el más pequeño identificado) y 300 nm aproximadamente y un área del 92.4 % del material con presencia de mesoporos. Se puede concluir que la nanotopografía formada según el análisis de microscopías era mayormente uniforme sobre toda la superficie de la muestra de titanio analizada.

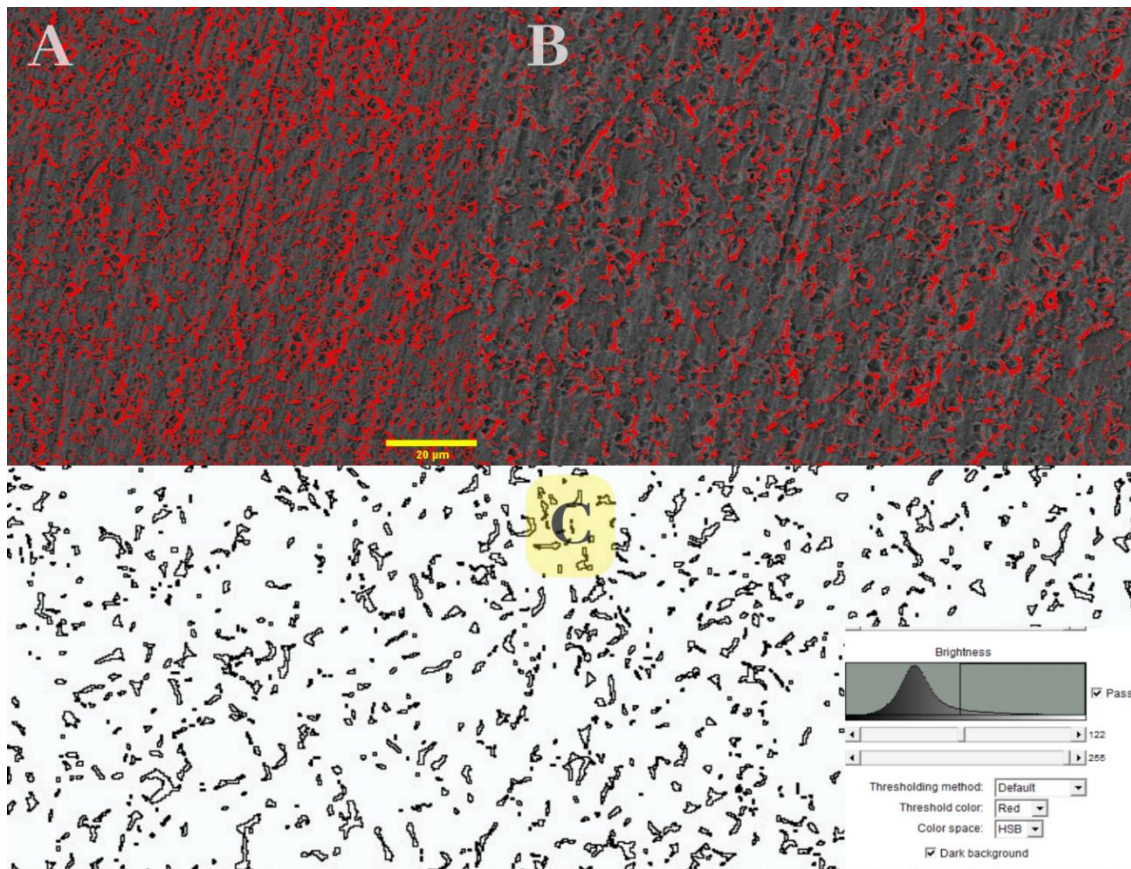


Figura 4.2.: En esta sección se muestra cómo se analizaron las micrografías con la herramienta de análisis de partículas para obtener los tamaños de mesoporos que se formaron en la superficie del sustrato y determinar la eficiencia del grabado químico. En la sección A se observa el contraste de colores entre rojo y gris, la herramienta de medición de poros utiliza el contraste rojo para determinar las secciones identificadas como poros. La imagen B es un acercamiento de la zona donde se observan en rojo las delimitaciones de los mesoporos. En la zona C observamos el mapa creado por el programa indicando los mesoporos identificados excluyendo todo lo demás, la pequeña gráfica en la parte inferior derecha nos indica el área que abarca la formación de mesoporos por toda la superficie esta se indica como la sección más oscura de la gráfica es decir la curva que observamos en tonalidades oscuras y la zona más clara la parte final de la gráfica de lado derecho nos indica las zonas en las que no hubo formación de mesoporos.

Para complementar la información del rango de tamaño de mesoporos obtenidos por el estudio de partícula, se realizaron gráficas de distribución de frecuencia y además un estudio de distribución normal o campana de Gauss (Figura 4.3 y 4.4). El método permitió obtener una

confiabilidad aceptable del estudio, mismo que nos indica que la formación de mesoporos que más frecuentemente obtendremos con el método de grabado químico seleccionado será de 47 nm y 160 nm, también se muestran la variedad de tamaños de mesoporos que se midieron con la herramienta antes mencionada.

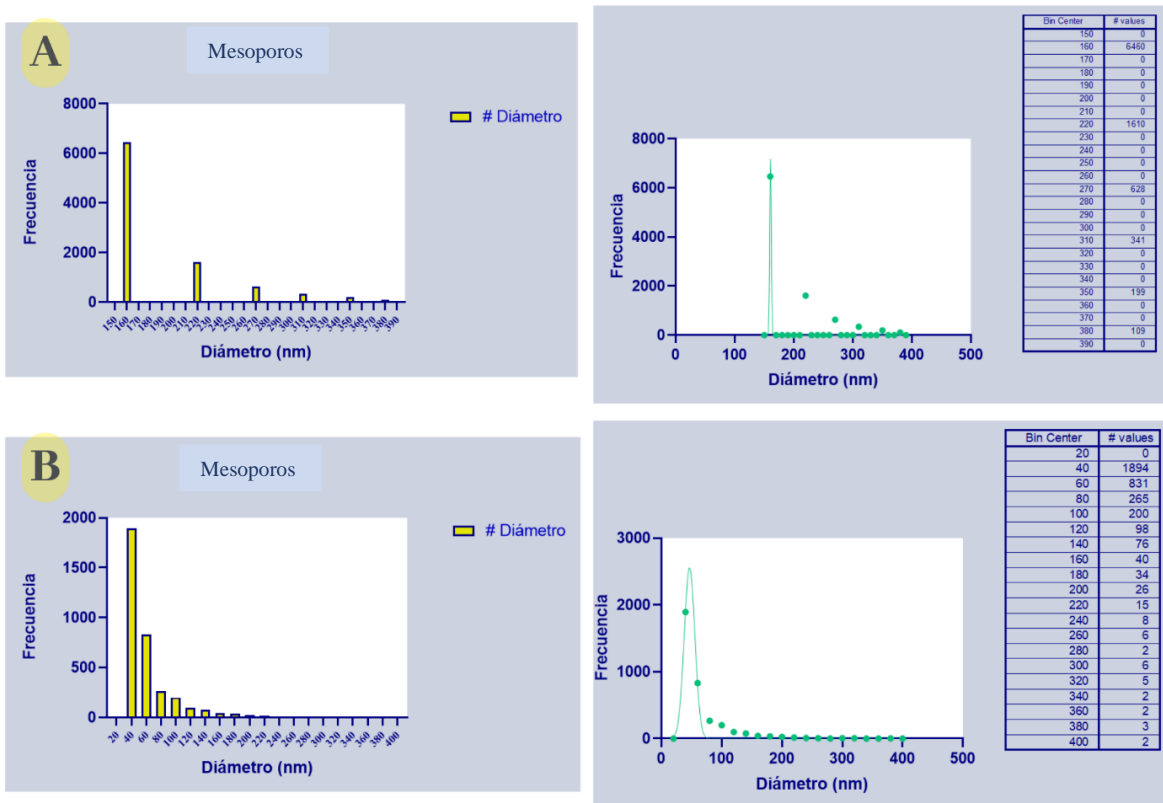


Figura 4.3: Las gráficas presentadas muestran la cuantificación y clasificación del tamaño de mesoporos formados gracias al método de grabado seleccionado, en la sección A se muestran los datos obtenidos del análisis de una selección de micrografías, la gráfica de distribución de frecuencias indica que para la zona elegida de estudio de las micrografías el tamaño de mesoporos con mayor frecuencia fue de 160 nm, y el estudio de distribución normal concluyó que el de mayor tamaño es de nm, en la sección B, el tamaño fue de 47 nm.

En la Figura 4.4 se muestran las diferentes micrografías donde se observa la formación de NPs, estas formaciones se encuentran dentro de los mesoporos, los estudios de análisis de partículas indicaron que el tamaño más pequeño de NPs fue de 8 nm y el más grande encontrado fue de 60 nm.

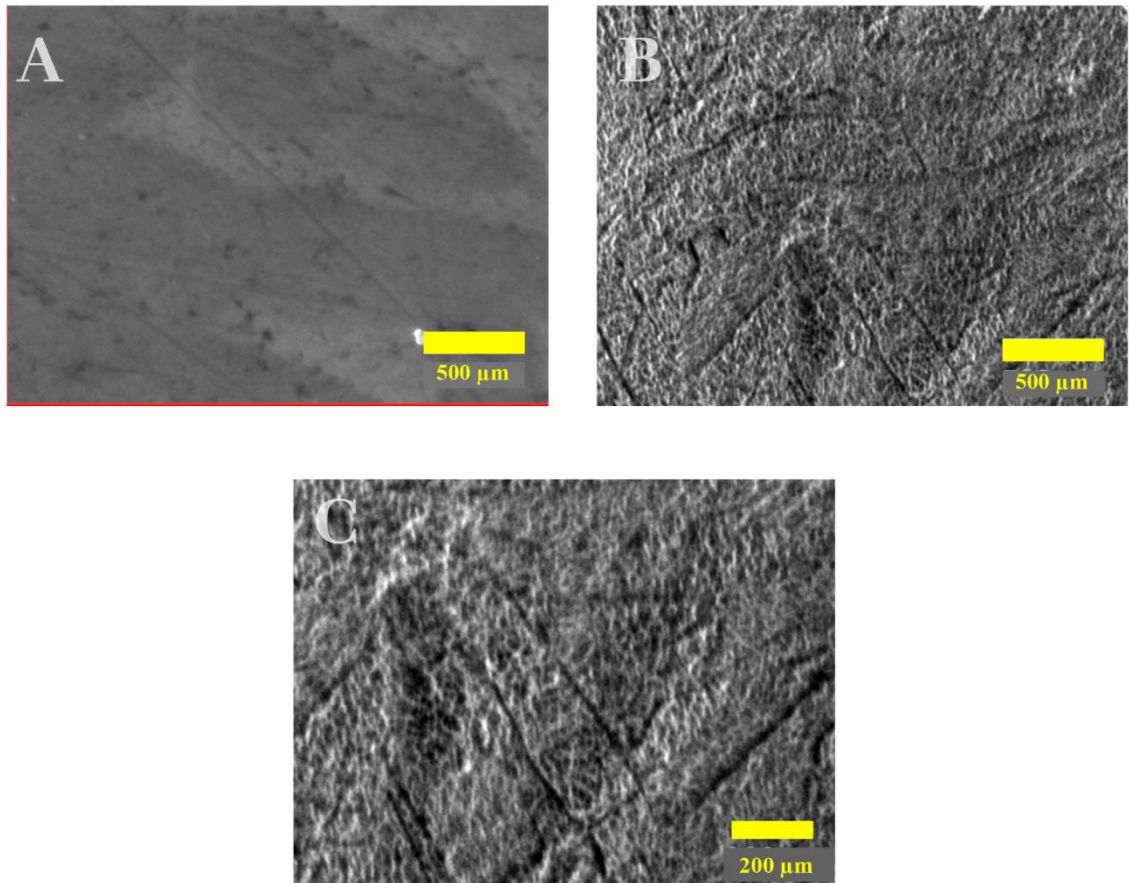


Figura 4.4: FE-SEM de alta magnificación: en las micrografías A y B se muestra la nanotopografía generada por los NPs. La imagen C muestra una ampliación de una sección de la micrografía B, en la que se observa la forma de los nanoporos.

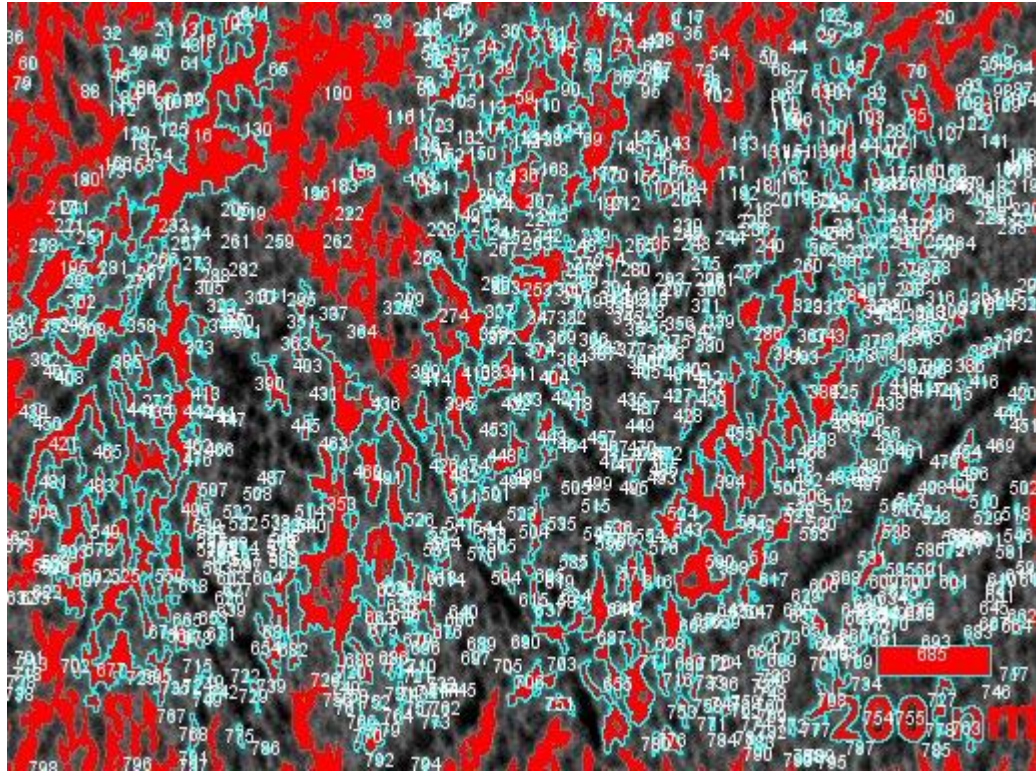


Figura 4.5: En esta imagen se muestra el estudio realizado con el programa Image J, análisis de partículas, en donde numera cada nanoporos encontrado.

Para terminar el estudio de la superficie y la nanotopografía generada, se realizó el estudio de distribución de frecuencias y distribución normal, en el que se encontró que existen dos tamaños de NPs que se van a generar, el más pequeño de 11.23 nm y el más grande rondando en los 30 nm, dichos estudios se ejemplifican con las Figuras 4.6 y 4.7.

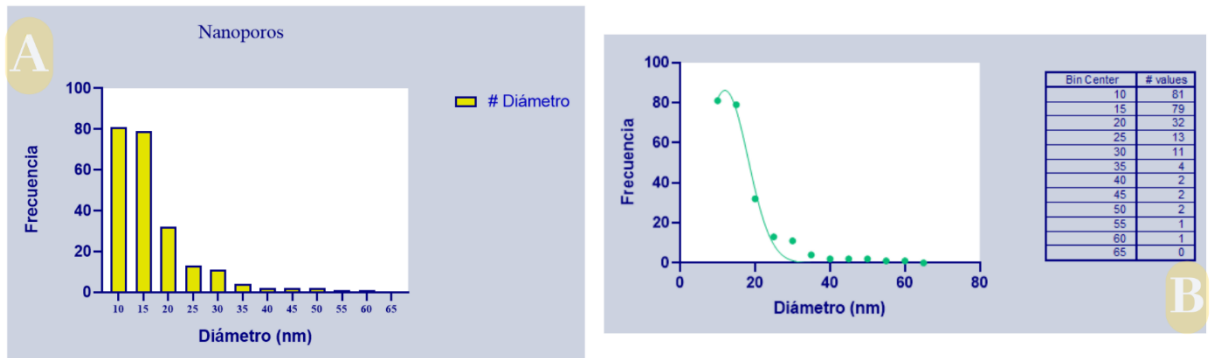


Figura 4.6: En esta imagen se muestra el estudio de distribución de frecuencias y distribución normal a partir de las mediciones obtenidas de la micrografía de la Figura 4.4 en la que se determinó que el tamaño de NPs más comúnmente formado es de 11.24 nm

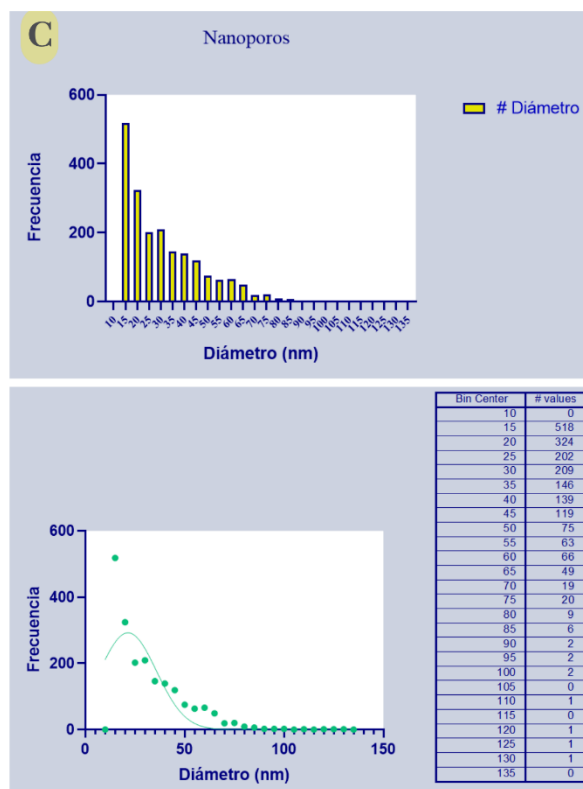


Figura 4.7: Las gráficas presentadas muestran la cuantificación y clasificación del tamaño de NPs el estudio de distribución de frecuencias señala que otro de los tamaños con mayor probabilidad de formarse es el de 30 nm aproximadamente.

Se complementó el estudio de micrografías anteriormente descrito con estudios de EDS, como se muestra en la *Figura 4.8*. Con estos análisis se buscaba comprender y comprobar si la química superficial resultó en cambios debido al tratamiento químico utilizado para la formación de NPs, y poder comparar los demás estudios de EDS obtenidos de los diferentes sustratos. De esta forma se puede determinar si dichas variaciones influían en las diferencias encontradas en los ensayos microbiológicos y de cultivo celular.

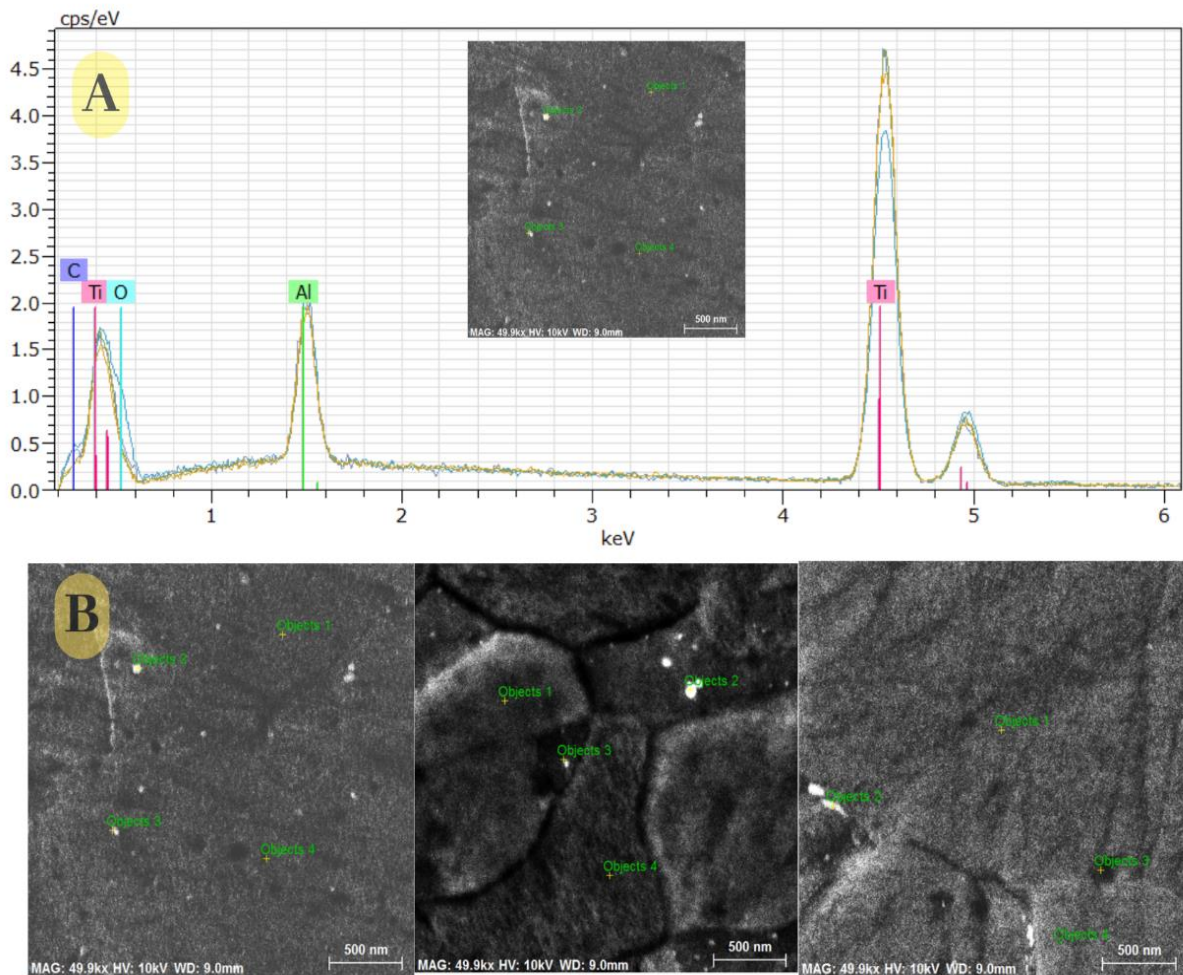


Figura 4.8: A) análisis de EDS de los NPs. B) muestra una serie de tres micrografías, la primera de lado izquierdo muestra la imagen con mayor amplitud, las imágenes restantes son ejemplo de las microscopias utilizadas para el estudio completo.

La modificación con NPs a la superficie del material por el método de oxidación química controlada puede provocar modificaciones en la química elemental del material, debido a esto se compara la *Tabla 4.1* que muestra la composición elemental porcentual del estudio de los sustratos modificados y la *Tabla 4.2* obtenida de sus hojas de datos para composiciones elementales de titanio y aleaciones del sitio [web: bohler.mx/es/recubrimiento/](http://web:bohler.mx/es/recubrimiento/) distribuidores de aceros para diferentes tipos de industria, en donde claramente podemos observar un aumento en el porcentaje del elemento oxígeno.

SUSTRATO	EDS			
	COMPOSICIÓN ELEMENTAL %			
	C	O	Al	Ti
n-Poros	1.99	17.38	5.95	85.12

Tabla 4.1: Estudio EDS representación de la composición porcentual de los elementos químicos encontrados en la superficie del sustrato modificado nanoporoso.

Composición Química %				
Ti	Al	V	N	Otros
Bal.	5.50 - 6.75	3.50 - 4.50	0.03 máx.	C 0.08 máx. O 0.20 máx. H 0.015 máx.

Tabla 4.2: Estudio EDS representación de la composición porcentual de los elementos químicos encontrados en la superficie de una muestra de titanio grado 5 comercial. Fuente: [web: bohler.mx/es/recubrimiento/](http://web:bohler.mx/es/recubrimiento/)

4.2. CARACTERIZACIÓN DE LOS SUSTRATOS DE NANOPOROSOS DE DIÓXIDO DE TITANIO DOPADOS CON PLATA, COBRE Y PLATA, COBRE.

La incorporación de los elementos metálicos de Ag y Cu se llevó a cabo con éxito, de acuerdo al análisis de FE-SEM obtenidas del estudio de los sustratos dopados con Ag, los dopados con Cu y la última muestra con la combinación de ambos elementos, formándose nanopartículas de ambos metales sobre la superficie de las muestras. Estos resultados sugieren una redistribución de especies de naturaleza iónica entre distintas zonas del material después del proceso de oxidación química [52].

La evaluación de los sustratos NPs dopados consistió principalmente en identificar la configuración morfológica adoptada por el dopaje, por lo que el estudio de FE-SEM mostrado en la *Figura 4.6* revela que el elemento de Ag se añadió en la superficie del material en forma de nanopartícula.

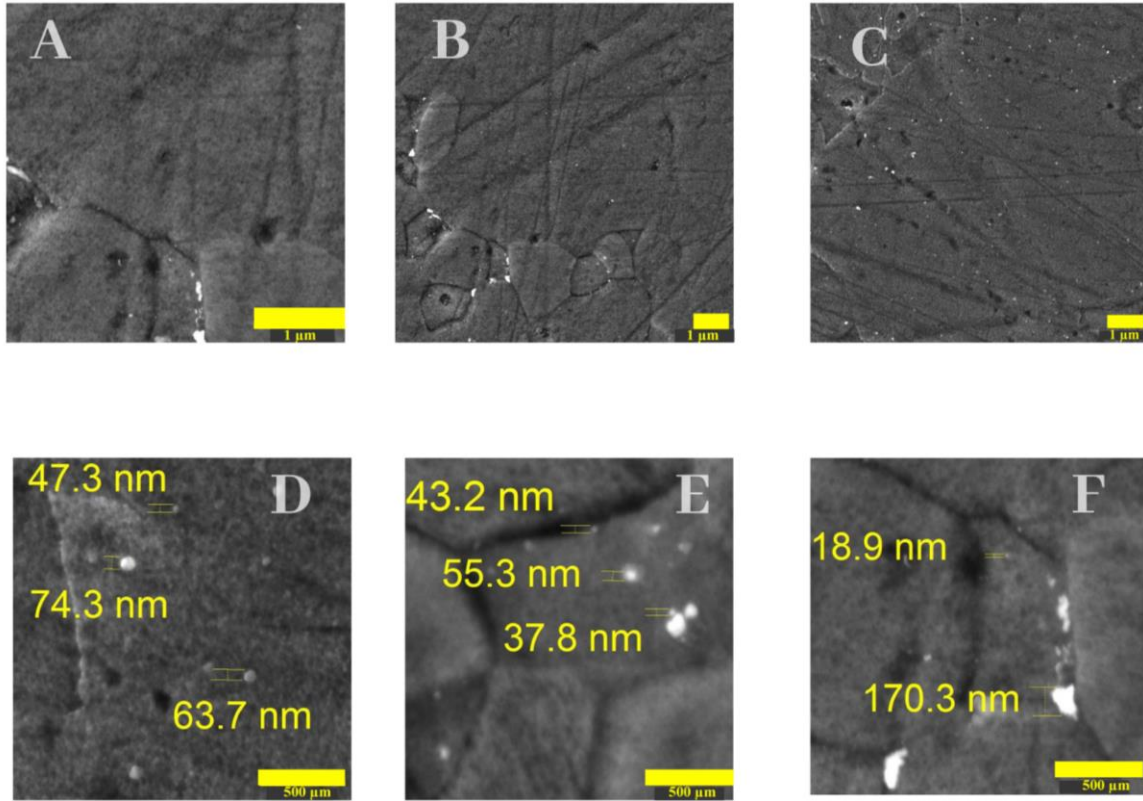


Figura 4.9: Las micrografías A, B y C muestran tres diferentes secciones del sustrato dopado con Ag analizado, las zonas más brillantes muestran la presencia de nanopartículas de plata dopadas a la superficie del material en formas irregulares. La sección D, E y F señalan un acercamiento a las zonas dopadas con nanopartículas de plata y se ilustrando las mediciones de dichas partículas.

Siguiendo con la línea de análisis, es importante comprobar que los elementos metálicos se encuentran en la superficie analizada, el estudio EDS para el sustrato nanoporoso dopado de plata confirmó el hallazgo, tal como se muestra en la *Figura 4.7*, y en la *Tabla 4.3* la química elemental porcentual de dicho estudio.

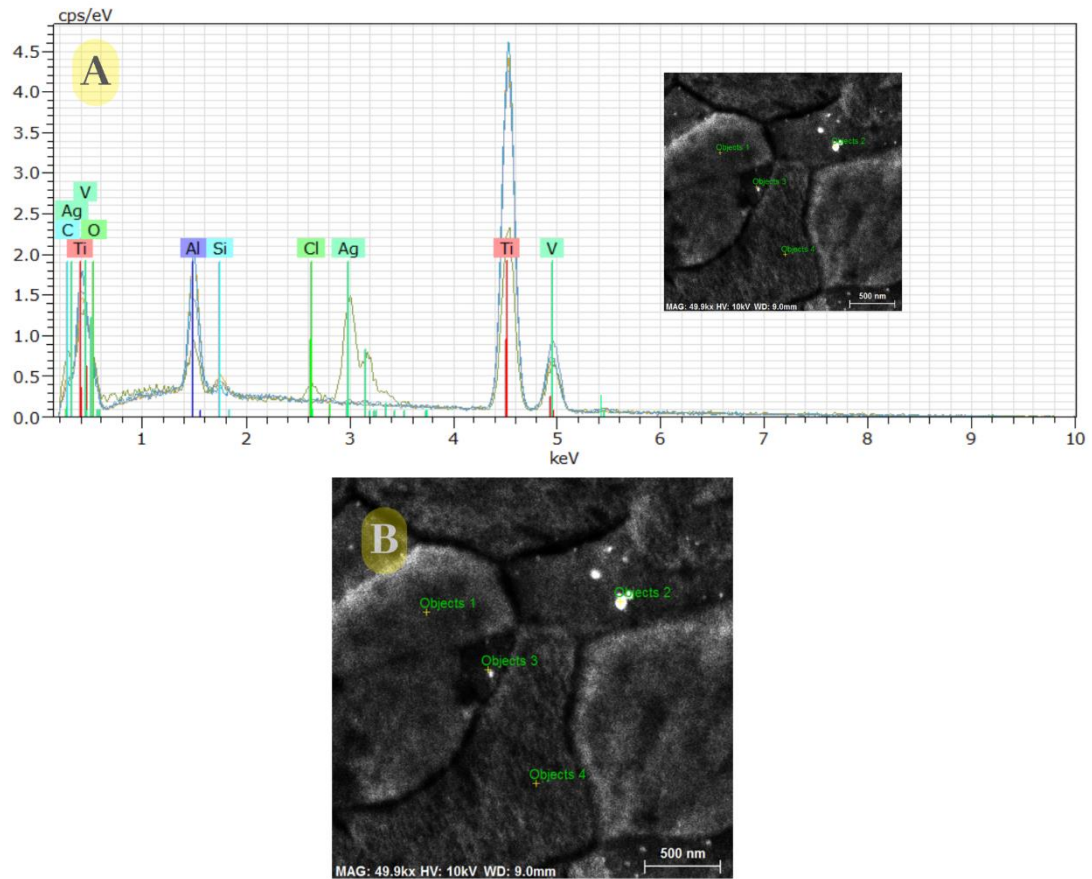


Figura 4.10: A) muestra el análisis EDS confirmando la presencia de plata. B) acercamiento de la microscopía analizada señala los puntos de análisis.

SUSTRATO	EDS							
	COMPOSICIÓN ELEMENTAL							
	%							
	C	O	Al	Si	Cl	Ti	V	Ag
n-Poros-AgNPs	1.99	17.38	5.95	0.82	0.73	74.06	9.42	19.72

Tabla 4.3: Estudio EDS representación de la composición porcentual de los elementos químicos encontrados en la superficie del sustrato nanoporoso dopado con plata.

Los sustratos de Cu (Figura 4.8, 4.9 y Tabla 4.4) y Ag/Cu (4.11 y Tabla 4.5), fueron analizados de igual forma como se muestra a continuación:

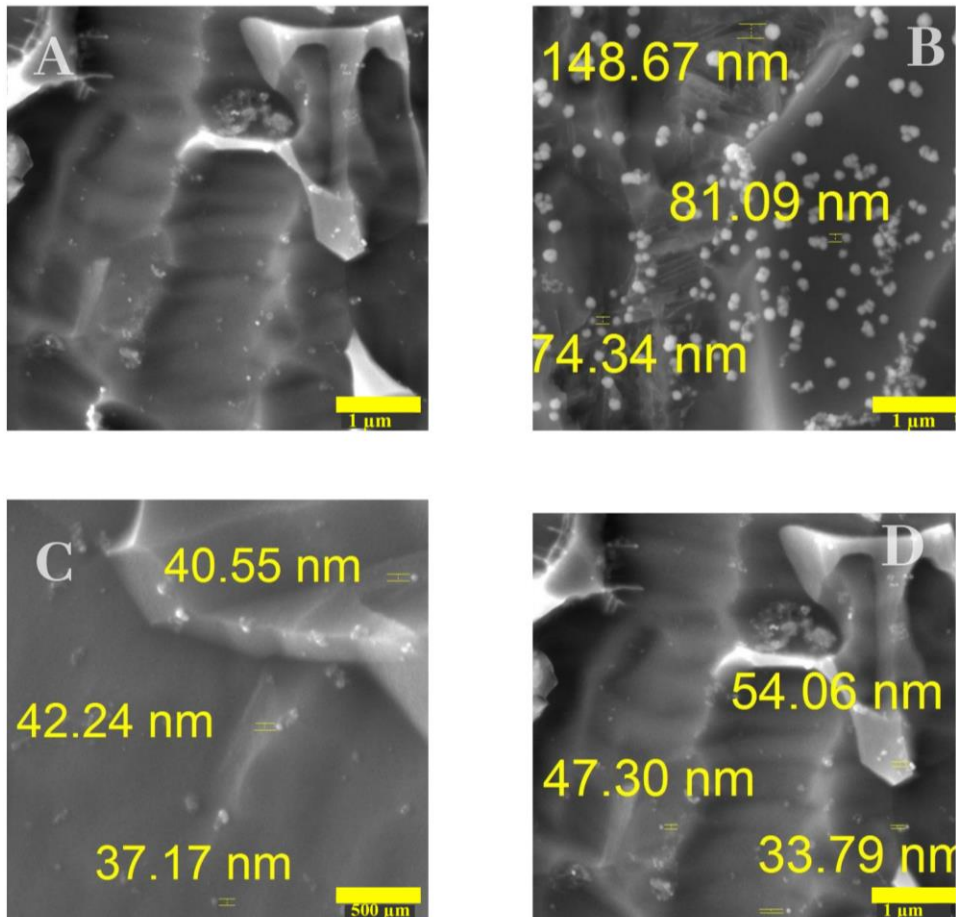


Figura 4.11: Micrografías la presencia de nanopartículas de Cu, como se observa en A). Las imágenes B), C) y D), revelan diferentes secciones y acercamientos de la muestra donde se identifica la morfología de las nanopartículas de Cu y sus dimensiones.

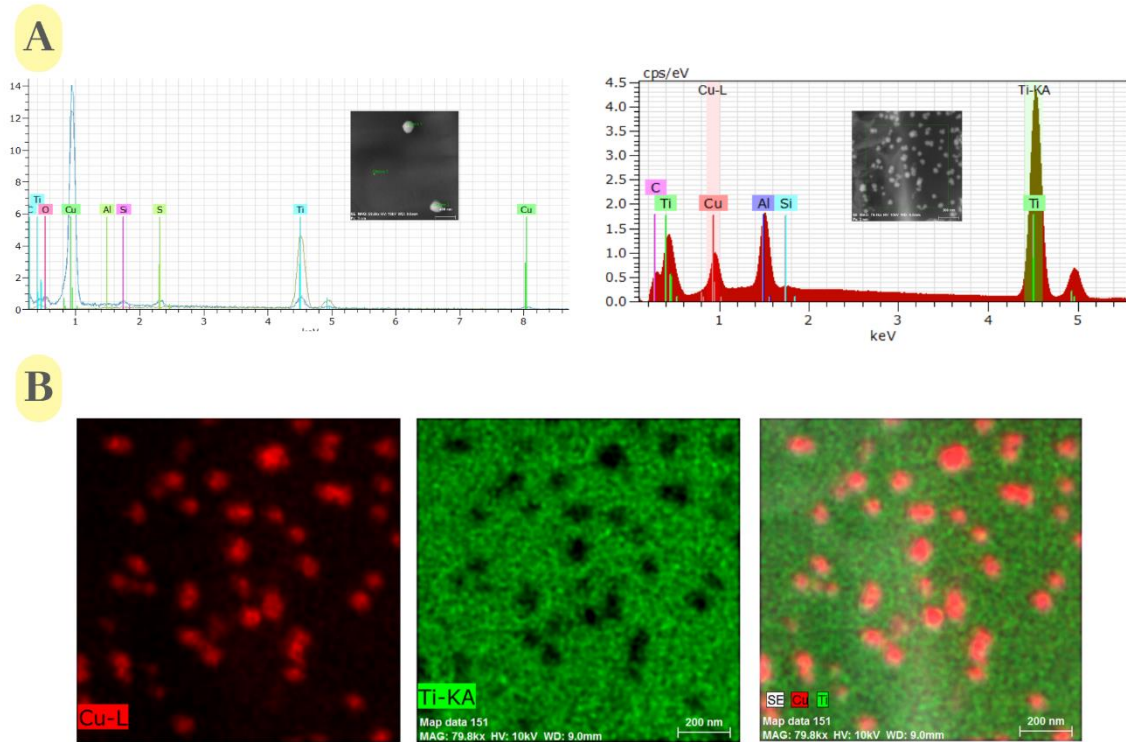


Figura 4.12: A) muestra dos diferentes análisis EDS confirmando la presencia de cobre. B) ilustra el mapeo elemental realizado sobre las nanopartículas de cobre (señal de Cu en rojo y señal de Ti en verde).

SUSTRATO	EDS						
	COMPOSICIÓN ELEMENTAL						
	%						
	C	O	Al	Si	S	Ti	Cu
n-Poros-CuNPs	10.28	2.53	0.23	0.61	0.79	10.94	96.17

Tabla 4.4: Estudio EDS representación de la composición porcentual de los elementos químicos encontrados en la superficie del sustrato con NPs dopado con Cu (tabla correspondiente a la gráfica mostrada en la Figura 4.9)

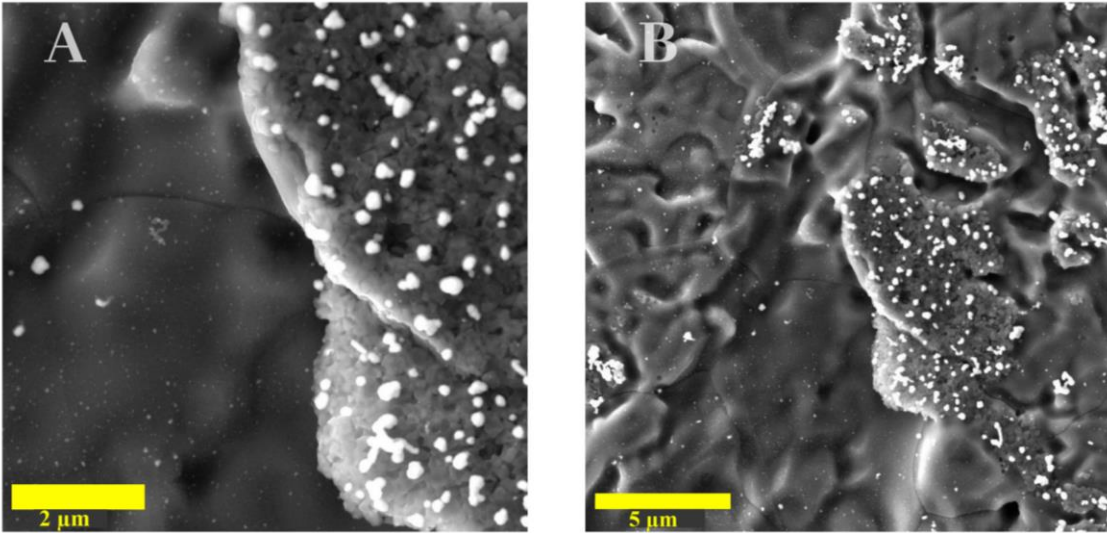


Figura 4.13: Las micrografías mostradas revelan la presencia de nanopartículas de plata y cobre en la sección A observamos su distribución y tamaños irregulares. B muestra un alejamiento de la zona con nanopartículas.

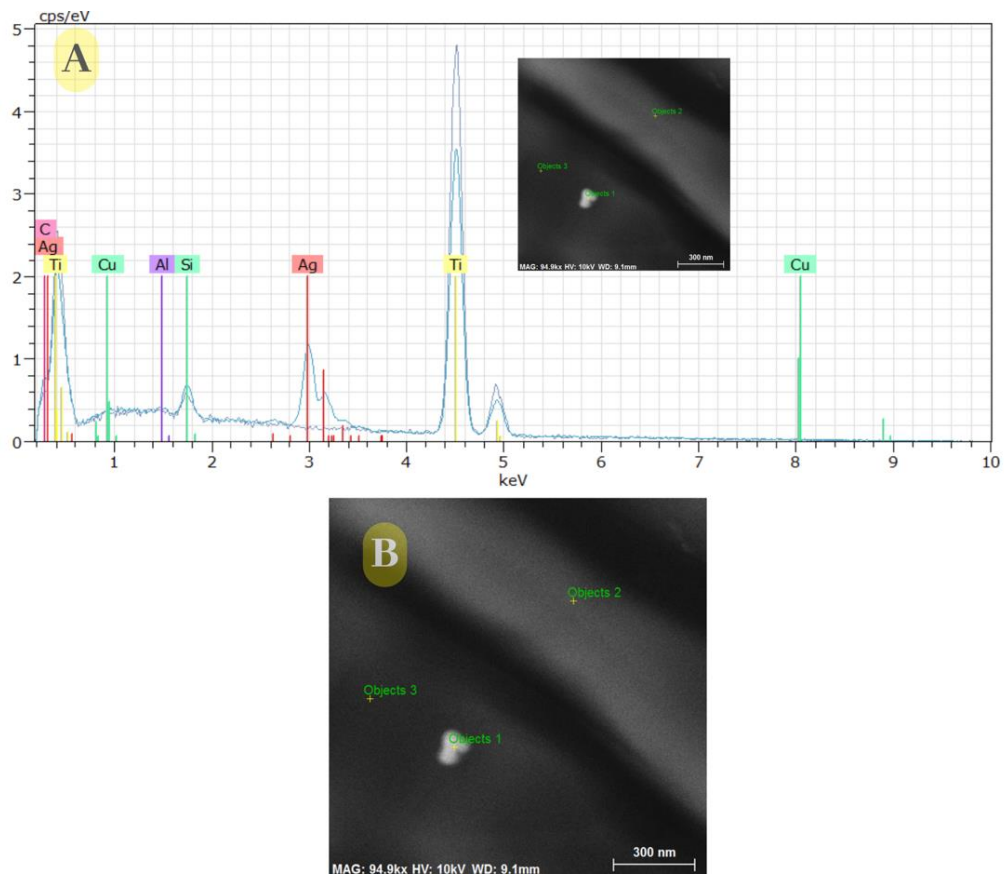


Figura 4.11: A) análisis de EDS confirmando la presencia de Ag y Cu. B) micrografía con amplificación realizado sobre las nanopartículas de plata y cobre encontradas en la superficie.

SUSTRATO	EDS					
	COMPOSICIÓN ELEMENTAL %					
	C	Al	Si	Ti	Cu	Ag
n-Poros- Ag- CuNPs	10.28	0.17	1.42	86.92	0.15	14.52

Tabla 4.5: Estudio EDS representativo de la composición porcentual de los elementos encontrados en la superficie del sustrato NPs dopado con Ag y Cu, validando la presencia de dichos elementos.

Conocer la forma y el tamaño de las nanopartículas de cobre y las de plata es fundamental para entender de una mejor forma el proceso de anclaje de dichas nanopartículas a la superficie del material, ya que puede sugerir la forma en que se lleva a cabo su proceso de capacidad bactericida. La forma de los elementos metálicos fue descrita anteriormente gracias a las microscopias obtenidas. Para determinar el tamaño de nanopartículas se recurrió a realizar el mismo análisis empleado en la medición de los poros, es decir se utilizó el programa Image J, específicamente la herramienta de análisis de partículas. En las *Figuras 4.12 y 4.13* se muestran las gráficas obtenidas, de las cuáles el análisis de distribución normal nos permitió determinar dos medidas sugiriendo que son la medida de nanopartículas que tiene mayor probabilidad de formarse (66.48 y 73.69 nm).

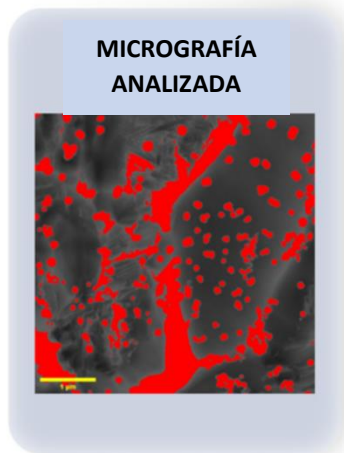
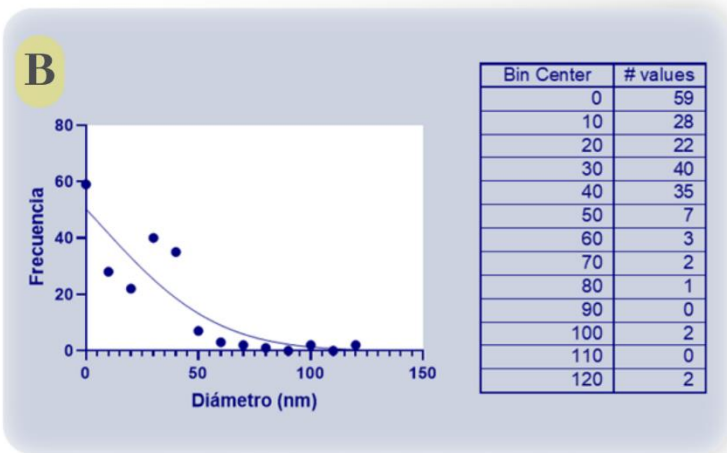
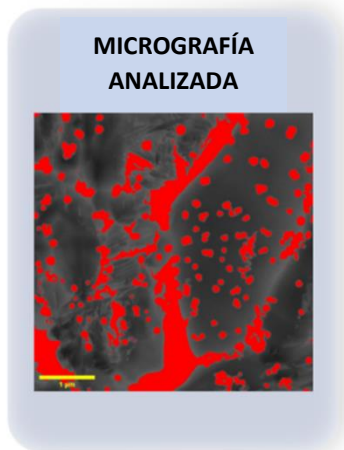
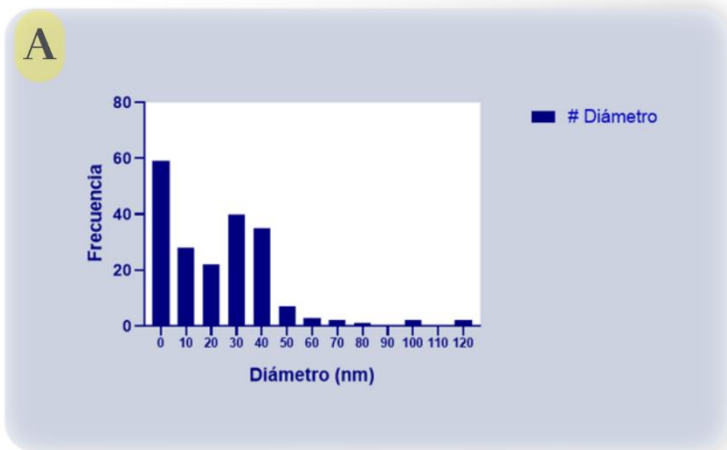


Figura 4.14: A) muestra la tabla de distribución de frecuencia de los diámetros encontrados con la herramienta de medición de análisis de partículas. B) muestra la micrografía analizada a la izquierda de la gráfica de distribución normal, las tonalidades rojas marcan las secciones con nanopartículas de cobre.

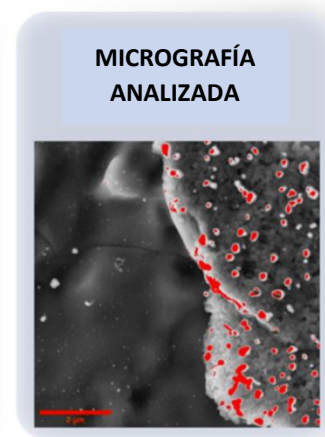
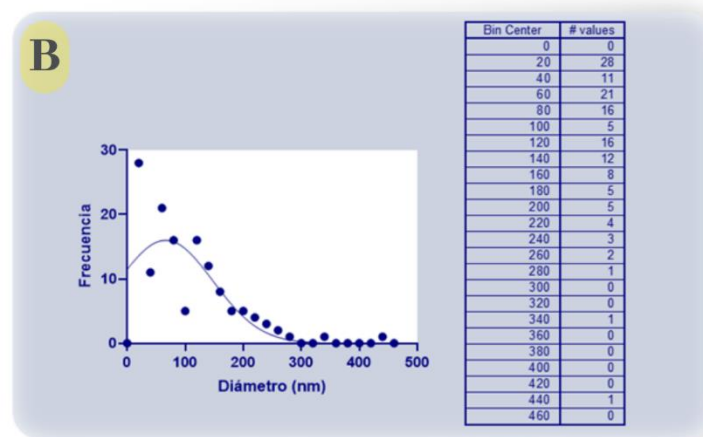
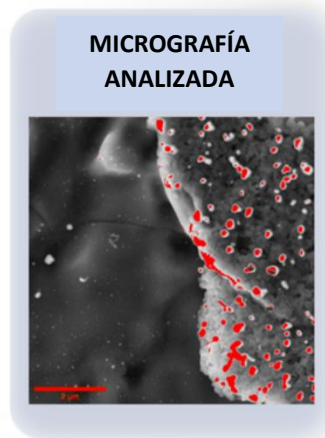
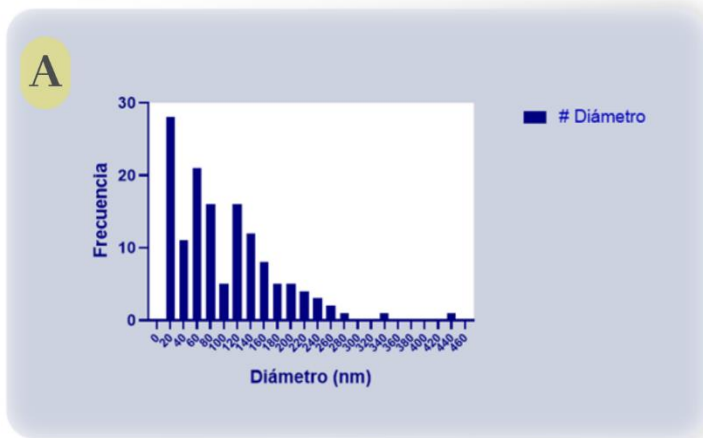


Figura 4.15: A) muestra la tabla de distribución de frecuencia de los diámetros encontrados con la herramienta de medición análisis de partículas. B) muestra la micrografía analizada de la gráfica de distribución normal, las tonalidades rojas marcan las secciones con nanopartículas de Cu y Ag.

4.3. ESTUDIO ÁNGULO DE CONTACTO

Las propiedades fisicoquímicas de la superficie de los sustratos son aspectos clave para deducir cuál será su comportamiento frente diferentes factores del medio biológico en el que serán implantados [44]. La energía de superficie es un parámetro necesario de conocer en materiales pensados para el uso biomédico como implantes y otros materiales que vayan a interactuar con fluidos biológicos. De acuerdo con esto, el ángulo de contacto está relacionado con la capacidad

de humectabilidad, la hidrofobicidad de la superficie y la capacidad de la adhesión de sustancias biológicas como proteínas u otros compuestos [45]. La técnica de medición de ángulo de contacto, permite medir la energía libre superficial de sólidos a partir de las ecuaciones de estado correspondientes [46]. En la Figura 4.14 se muestra el estudio de ángulo de contacto realizado para los sustratos en el que se puede destacar que las superficies con mayor capacidad de humectabilidad son los dopados con Ag y también con Cu. Por otro lado, los Ag+Cu presentaron menor humectabilidad y finalmente el control, el cual mostró mayor hidrofobicidad.

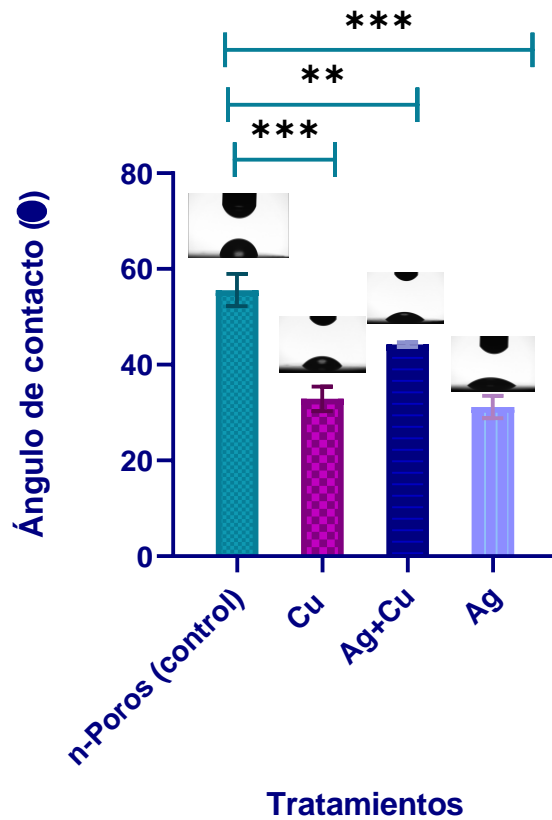


Figura 4.16: Se muestra la gráfica obtenida a través de los resultados del análisis de ángulo de contacto, se puede observar que existen diferencias significativas de los sustratos dopados frente al control.

4.4. ESTUDIOS DE DIFRACCIÓN DE RAYOS X (XRD)

El XRD es una de los métodos más utilizados para investigar el ordenamiento molecular de diferentes materiales. La difracción de rayos X es una técnica no destructiva de la muestra, ampliamente usada para la caracterización de materiales cristalinos y semicristalinos, capaz de proveer información sobre estructuras, fases, textura, tamaño promedio de grano, cristalinidad, deformación y defectos. Los picos observados en las gráficas son producidos por la interferencia constructiva de un rayo o de un flujo monocromático de rayos X dispersado a ángulos específicos, las intensidades son determinadas por la distribución de los átomos. El patrón de difracción de rayos X permite identificar los elementos o los compuestos encontrados en la muestra, dada sus características químicas reflejadas en cartas cristalográficas. [47,48]. Las Figuras de la 4.17 a la 4.20 son el resultado del estudio de XRD realizado para cada sustrato en las que se describen los elementos encontrados.

Comenzando con la Figura 4.17 correspondiente al control NPs, el estudio de XRD reveló las diferentes formas de TiO_2 encontradas sobre la superficie del material, con lo que se puede concluir que los NPs de TiO_2 se formaron como se esperaba y que dicho tratamiento químico provoca la formación de diferentes subespecies de TiO_2 en la imagen se describen detalladamente los porcentajes y las formas de TiO_2 encontradas.

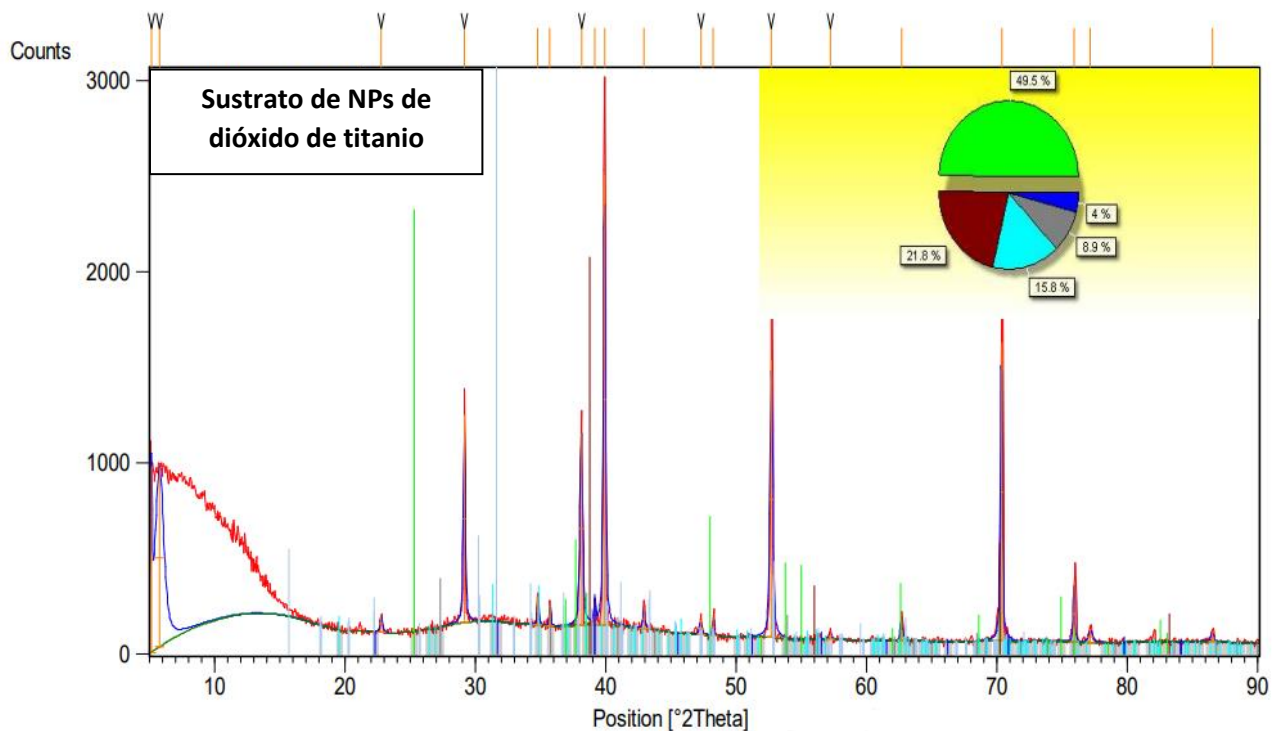


Figura 4.17: Análisis de XRD de NPs, el color verde muestra un 49.5% de anatasa una de las formas en que se puede encontrar al dióxido de titanio ($TiO_{2(IV)}$), el color café con un 21.8% del total de los elementos encontrados el cual corresponde a Ti. La sección de color azul celeste es 15.8% muestra una versión de dióxido de titanio de fórmula Ti_4O_8 . El porcentaje del contenido de los elementos encontrados correspondiente al 8.9%, el color gris en la gráfica de pastel corresponde al mineral rutilo compuesto de TiO_2 , y finalmente el porcentaje menor corresponde a titanio puro.

La Figura 4.18, correspondiente al sustrato de NPs de dióxido de titanio dopados con NPs-Ag, corrobora la presencia de plata sobre la superficie del material, al igual que otros elementos que componen la aleación Ti-6Al-4V como dióxido de aluminio. Es importante destacar que el estudio de XRD realizado para este sustrato en particular revela que la adición de plata se da en diferentes formas plata y óxidos de plata.

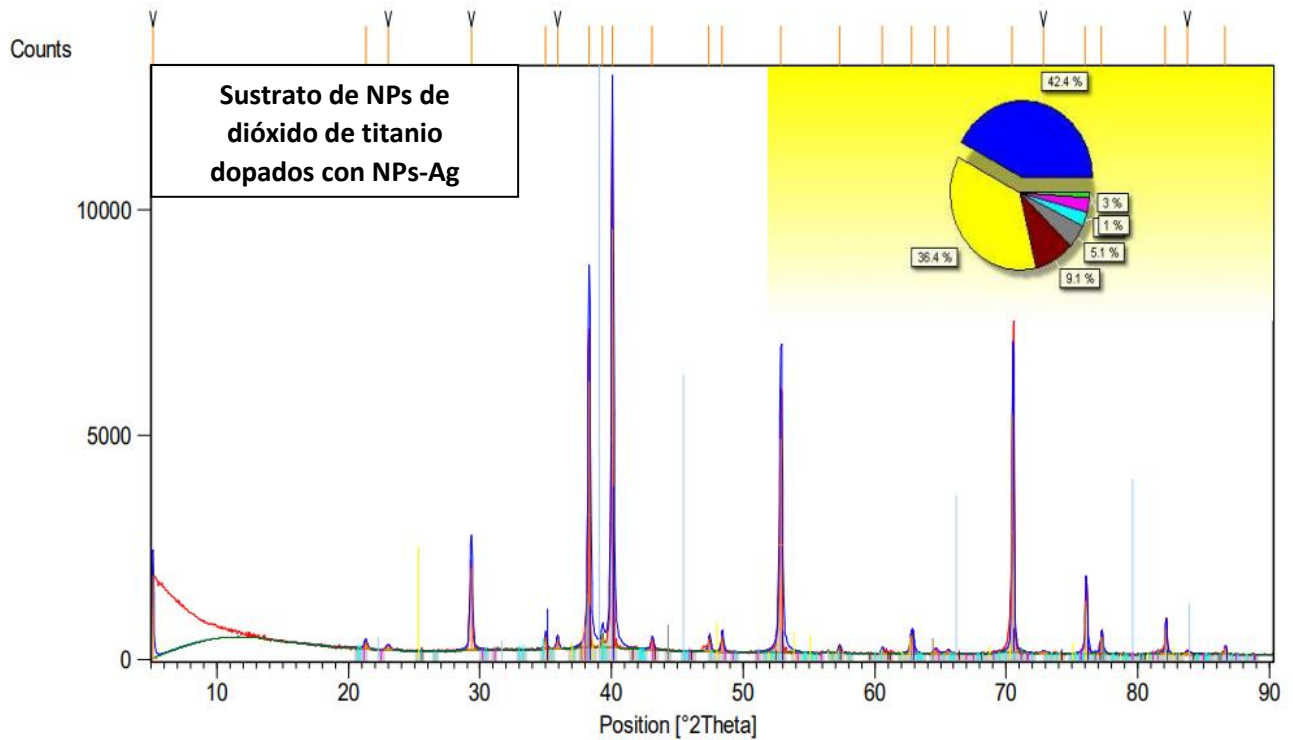


Figura 4.18: La figura muestra las gráficas del estudio XRD con dopaje de Ag, se puede observar el 42.4% que corresponde al elemento Ti, la parte de la gráfica en color amarillo correspondiente al 36.4% de anatasa, el color marrón denota el porcentaje encontrado del elemento corundum mineral compuesto de óxido de aluminio, la parte coloreada en gris corresponde al elemento plata, la azul claro corresponde al compuesto Ag (Al O₂) y finalmente el último elemento corresponde AgTi₃.

La Figura 4.19, correspondiente al sustrato de NPs de dióxido de titanio dopados con NPs-Cu, corrobora la presencia de plata sobre la superficie del material, al igual que otros elementos que componen la aleación Ti-6Al-4V como dióxido de aluminio. Es importante destacar que el estudio de XRD realizado para este sustrato en particular revela que la adición de cobre se da en diferentes formas de óxidos de cobre (cuprita, tenorita) y vanadato de cobre (blossite).

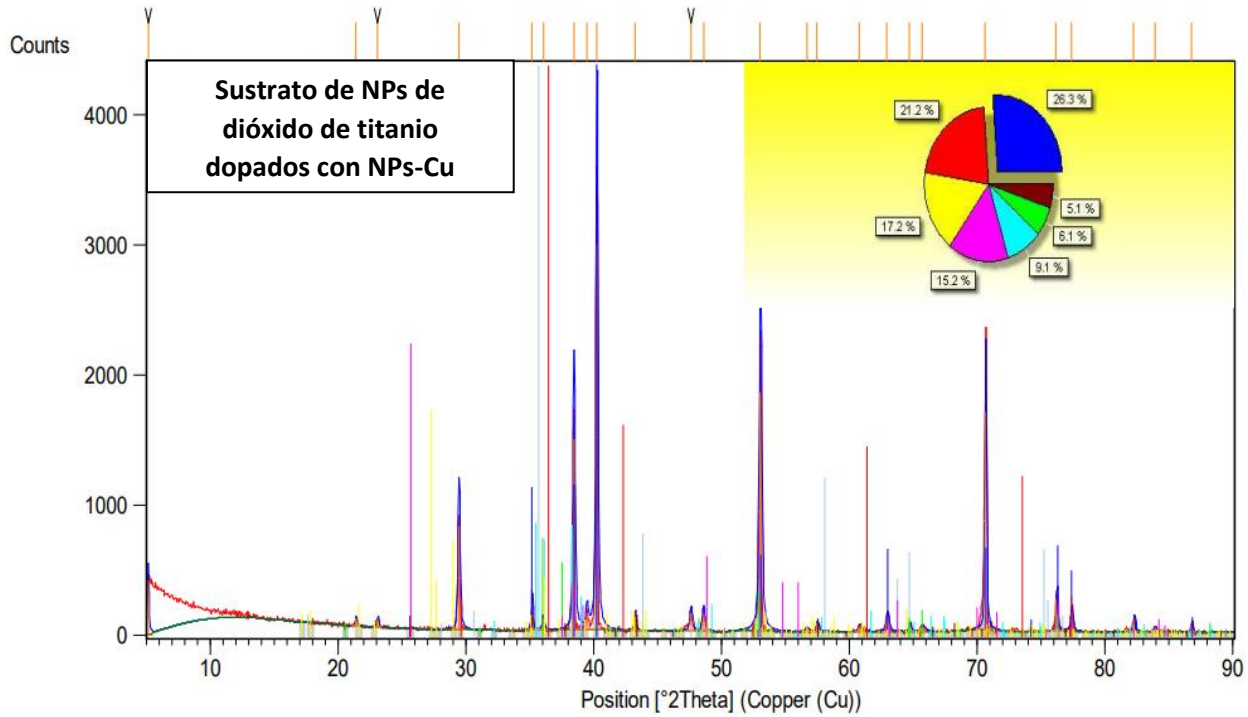


Figura 4.19: Estudio de XRD para el sustrato dopado con Cu. La gráfica de pastel muestra los porcentajes de los elementos encontrados en el análisis, en la sección correspondiente al color azul marino se representa el elemento de Ti puro, la sección en rojo representa el porcentaje encontrado de cuprita forma mineral del óxido de Cu. La sección en amarillo representa al el mineral blossomite (vanadato de cobre). La sección en rosa representa al compuesto anatasa. El color azul claro representa el porcentaje de tenorita forma mineral del óxido de Cu. En color verde se encuentra el compuesto de óxido de titanio finalmente el último compuesto corresponde a óxido de aluminio.

La Figura 4.20, correspondiente al sustrato de NPs de dióxido de titanio dopados con NPs-Ag/Cu, corrobora la presencia de cobre y plata sobre la superficie del material, al igual que otros elementos que componen la aleación Ti-6Al-4V. Es importante destacar que el estudio de XRD realizado para este sustrato en particular revela que la adición de plata y cobre se da en diferentes formas de plata y óxidos de plata, al igual que cobre y distintos óxidos de cobre (cuprita, tenorita) y vanadato de cobre (blossite).

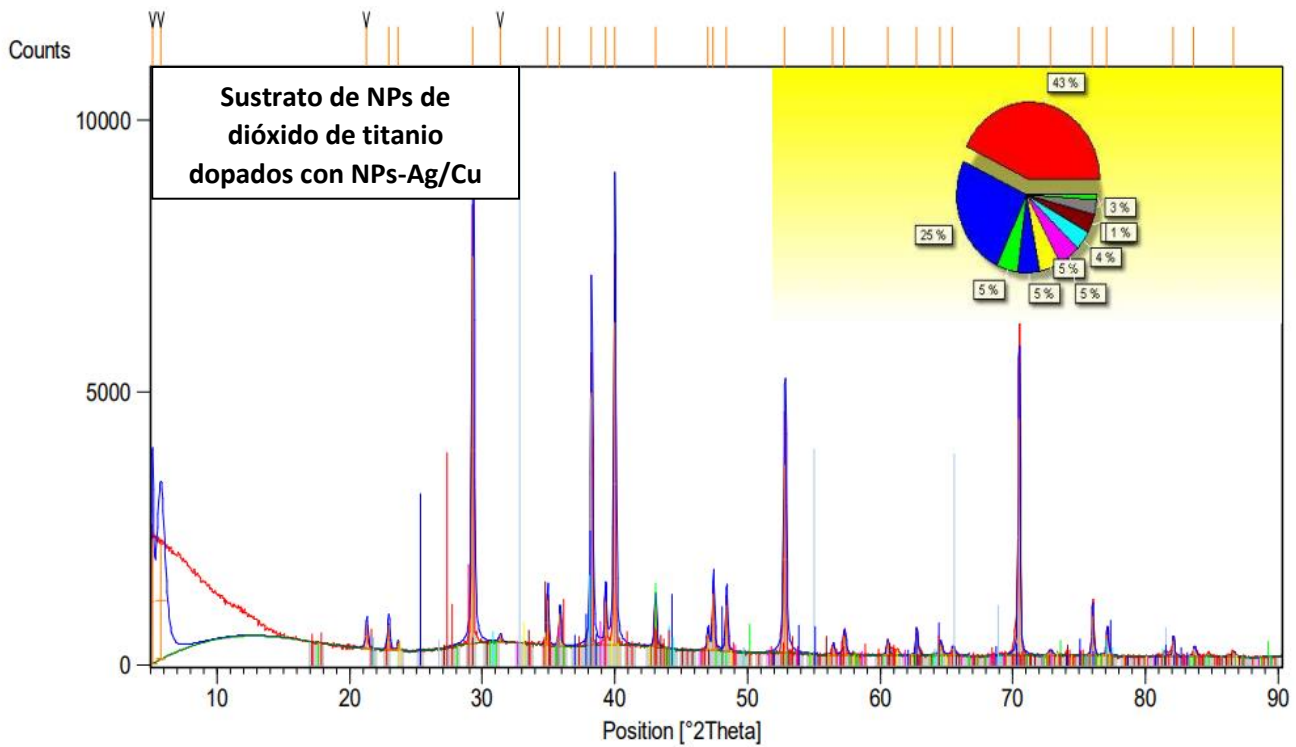


Figura 4.20: Estudio de XRD realizado para el sustrato dopado con Ag y Cu, los porcentajes más sobresalientes mostrados en la gráfica de pastel corresponden a la Blossita (vanadato de cobre anhidrido, color rojo) y en color azul el elemento de Ag. La sección verde y azul marino en menor porcentaje corresponden a Cu y anatasa. La sección amarilla, rosa y azul claro representa, óxido de Ti, tenorita (rosa) mineral compuesto de óxido de Cu y finalmente una combinación de Ag y Ti. En la sección marrón y gris encontramos, el compuesto Óxido de Ag(I) Cu(III) y por último Ti.

4.5. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS MICROBIOLÓGICOS

En el estudio de los ensayos para determinar la actividad antimicrobiana de los sustratos modificados, utilizando la metodología de unidades formadoras de colonias (UFC), la información obtenida se analizó y se graficaron los resultados aplicando ONE WAY ANOVA, cabe aclarar que en todas las gráficas mostradas a continuación, presentan una comparación entre los cuatro diferentes sustratos, aunque todos los sustratos mostraron una reducción considerable en la carga microbiana inicialmente inoculada, en algunos de los casos se mostró una reducción microbiana del 100% como lo muestra la *Figura 4.22* la gráfica de *S. enterica* y la *Figura 4.21*, la gráfica de *P. aeruginosa*, este efecto lo asociamos al sustrato dopado de plata y cobre. Las gráficas fueron clasificadas, las bacterias Gram positivas fueron graficadas con fondo amarillo, las Gram negativas con fondo verde, finalmente *C. albicans* en fondo azul.

En la *Figura 4.21* se muestra la gráfica obtenida del estudio de análisis de superficie contra microorganismos, en la que el conteo en placa muestra una diferencia significativa de inhibición (indicada como “**”) entre el control (NPs) y los sustratos dopados. En la gráfica se muestra que el sustrato NPs y el sustrato dopado con plata (Ag), al compararse, no presenta diferencia significativa frente a su capacidad de inhibición, esto se indica en la gráfica como “ns”. Asimismo, los sustratos dopados con nanopartículas (Cu, Ag+Cu, Ag) no presentan diferencias significativas de inhibición, con excepción de la diferencia (indicada como “*”; dando a entender una diferencia que es significativa pero menor que la indicada como “**”) entre cobre (Cu) y plata (Ag).

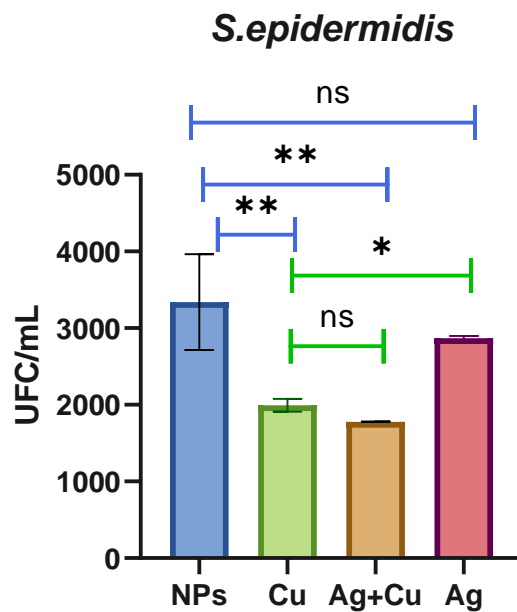
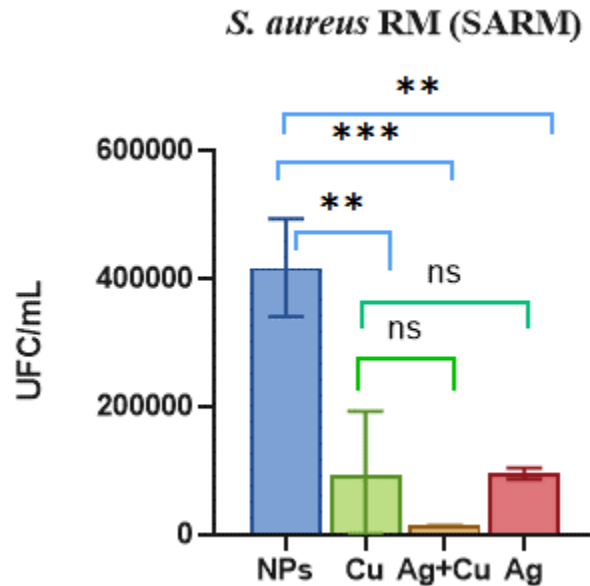


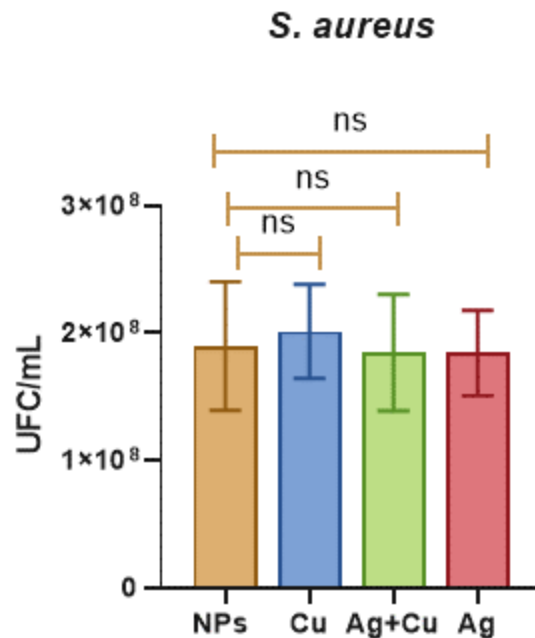
Figura 4.21: Gráfica de la evaluación de los sustratos frente al microorganismo S. epidermidis, “ns” indica que no hay una diferencia significativa en la comparativa, “” indica que hay una diferencia significativa en la comparativa, “**” indica que hay una diferencia aún más significativa en la comparativa que la indicada sólo por “*”. El sustrato nombrado “Ag+Cu” mostró una mayor capacidad bactericida frente a los demás sustratos evaluados.*

En la *Figura 4.22* se muestra la gráfica obtenida del estudio de análisis de superficie contra microorganismos, en la que el conteo en placa muestra una diferencia significativa de inhibición (indicada como “***” y “**”) entre el control (NPs) y los sustratos dopados. En la gráfica se muestra que el sustrato NPs y el sustrato dopado con plata y cobre (Ag+Cu), al compararse, presentan la diferencia más significativa en inhibición. Asimismo, los sustratos dopados con nanopartículas (Cu, Ag+Cu, Ag) no presentan diferencias significativas de inhibición entre ellos.



*Figura 4.22: Gráfica de la evaluación de los sustratos frente al microorganismo *S. aureus* RM (SARM), “ns” indica que no hay una diferencia significativa en la comparativa, “*” indica que hay una diferencia significativa en la comparativa, “**” indica que hay una diferencia aún más significativa en la comparativa que la indicada sólo por “*”, “***” indica que hay una diferencia aún más significativa en la comparativa que la indicada sólo por “**”. El sustrato nombrado “Ag+Cu” mostró una mayor capacidad bactericida frente a los demás sustratos evaluados.*

En la *Figura 4.23* se muestra la gráfica obtenida del estudio de análisis de superficie contra microorganismos, en la que el conteo en placa muestra que no existe una diferencia significativa de inhibición entre el control (NPs) y los sustratos dopados. Sin embargo, es importante mencionar que esto no implica una ausencia de inhibición en el conteo de placa, ya que en los sustratos se inoculó una concentración bacteriana mayor a la obtenida como resultado del estudio, únicamente indica que los sustratos tuvieron una capacidad bactericida estadísticamente equivalente.



*Figura 4.23: Gráfica de la evaluación de los sustratos frente al microorganismo *S. aureus*, “ns” indica que no hay una diferencia significativa en la comparativa. Los sustratos no muestran una diferencia significativa entre ellos en ninguna de las comparativas, a pesar de esto todos los sustratos demuestran una capacidad bactericida.*

En la *Figura 4.24* se muestra la gráfica obtenida del estudio de análisis de superficie contra microorganismos, en la que el conteo en placa muestra que no existe una diferencia significativa de inhibición entre el control (NPs) y los sustratos dopados. Sin embargo, es importante mencionar que esto no implica una ausencia de inhibición en el conteo de placa, ya que en los sustratos se inoculó una concentración bacteriana mayor a la obtenida como resultado del estudio, únicamente indica que los sustratos tuvieron una capacidad bactericida estadísticamente equivalente. A pesar de que estadísticamente no se observe una diferencia significativa entre el efecto de los sustratos, cabe destacar que el sustrato dopado de nanopartículas de plata y cobre (Ag+Cu) presentó una capacidad de inhibición total (no hubo crecimiento bacteriano alguno sobre la superficie).

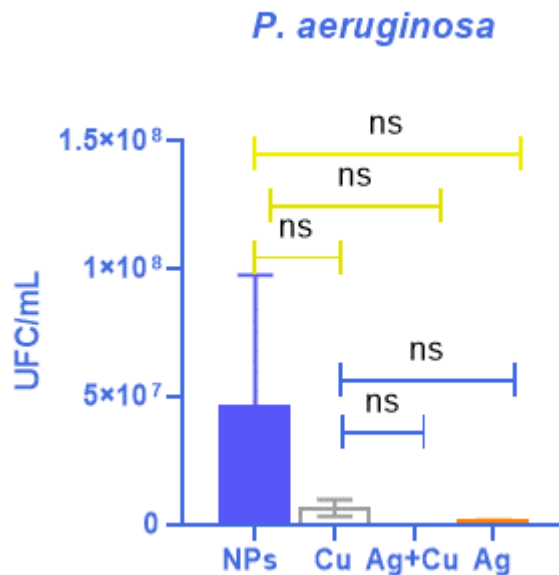


Figura 4.24: Gráfica de la evaluación de los sustratos frente al microorganismo P. aeruginosa, “ns” indica que no hay una diferencia significativa en la comparativa. Los sustratos no muestran una diferencia significativa entre ellos en ninguna de las comparativas, a pesar de esto todos los sustratos demuestran una capacidad bactericida, especialmente el denominado “Ag+Cu”, teniendo una inhibición total sobre la superficie.

En la *Figura 4.25* se muestra la gráfica obtenida del estudio de análisis de superficie contra microorganismos, en la que el conteo en placa muestra una diferencia significativa de inhibición entre el control (NPs) y los sustratos dopados con nanopartículas de cobre (Cu), y el de plata y cobre (Ag+Cu), y no muestra una diferencia significativa entre el control (NPs) y el sustrato dopado de nanopartículas de plata (Ag).

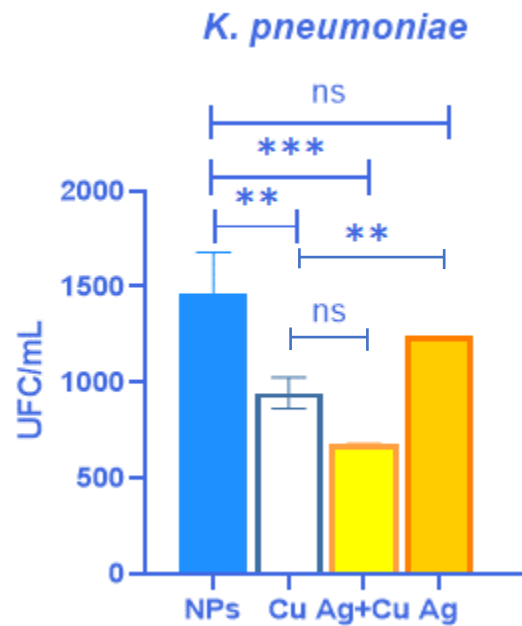
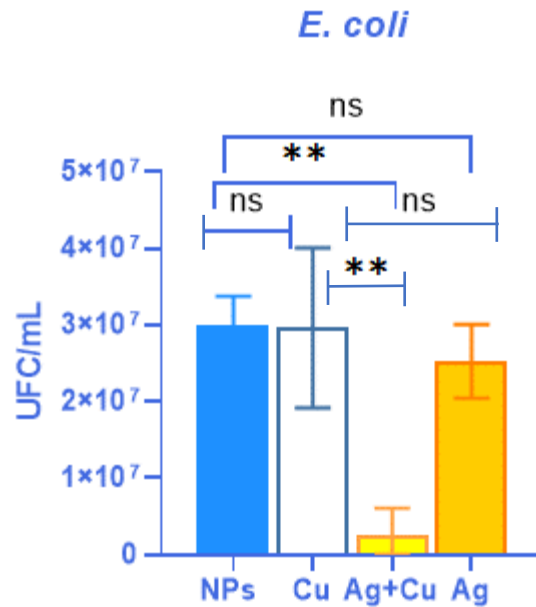


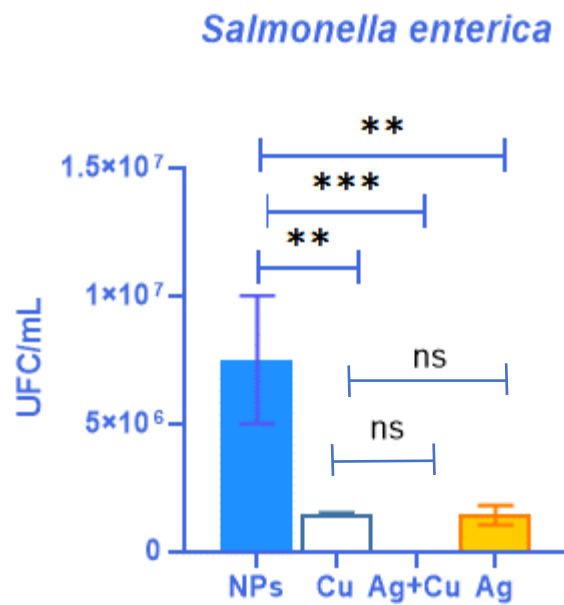
Figura 4.25: Gráfica de la evaluación de los sustratos frente al microorganismo *K. pneumoniae*, “ns” indica que no hay una diferencia significativa en la comparativa, “**” indica que hay una diferencia significativa en la comparativa, “***” indica que hay una diferencia aún más significativa en la comparativa que la indicada sólo por “**”. El sustrato nombrado “Ag+Cu” mostró una mayor capacidad bactericida frente a los demás sustratos evaluados.

En la *Figura 4.26* se muestra la gráfica obtenida del estudio de análisis de superficie contra microorganismos, en la que el conteo en placa muestra una diferencia significativa de inhibición entre el control (NPs) y el sustrato dopado con nanopartículas de plata y cobre (Ag+Cu). Además, este mismo sustrato también muestra diferencias significativas al compararse con el sustrato dopado con nanopartículas de plata (Ag) y contra el sustrato dopado con nanopartículas de cobre (Cu), sin embargo, ninguno de estos últimos dos muestras diferencias significativas entre sí, ni al compararse con el control (NPs).



*Figura 4.26: Gráfica de la evaluación de los sustratos frente al microorganismo E. coli, “ns” indica que no hay una diferencia significativa en la comparativa, “**” indica que hay una diferencia significativa en la comparativa. El sustrato nombrado “Ag+Cu” mostró una mayor capacidad bactericida frente a los demás sustratos evaluados.*

En la *Figura 4.27* se muestra la gráfica obtenida del estudio de análisis de superficie contra microorganismos, en la que el conteo en placa muestra una diferencia significativa de inhibición entre el control (NPs) y todos los sustratos, pero siendo más significativa la del dopado con nanopartículas de plata y cobre (Ag+Cu). Sin embargo, no se presenta una diferencia significativa al comparar entre ellos los sustratos dopados con alguna nanopartícula metálica.



*Figura 4.27: Gráfica de la evaluación de los sustratos frente al microorganismo S. enterica, “ns” indica que no hay una diferencia significativa en la comparativa, “**” indica que hay una diferencia significativa en la comparativa, “***” indica que hay una diferencia aún más significativa en la comparativa que la indicada sólo por “**”. El sustrato nombrado “Ag+Cu” mostró una mayor capacidad bactericida frente a los demás sustratos evaluados.*

En la *Figura 4.28* se muestra la gráfica obtenida del estudio de análisis de superficie contra microorganismos, en la que el conteo en placa no muestra una diferencia significativa de inhibición entre el control (NPs) y los sustratos. Sin embargo, es importante mencionar que esto no implica una ausencia de inhibición en el conteo de placa, ya que en los sustratos se inoculó una concentración bacteriana mayor a la obtenida como resultado del estudio, únicamente indica que los sustratos tuvieron una capacidad bactericida estadísticamente equivalente. A pesar de que estadísticamente no se observe una diferencia significativa entre el efecto de los sustratos, cabe destacar que el sustrato dopado de nanopartículas de plata y cobre (Ag+Cu) presentó una mayor capacidad de inhibición.

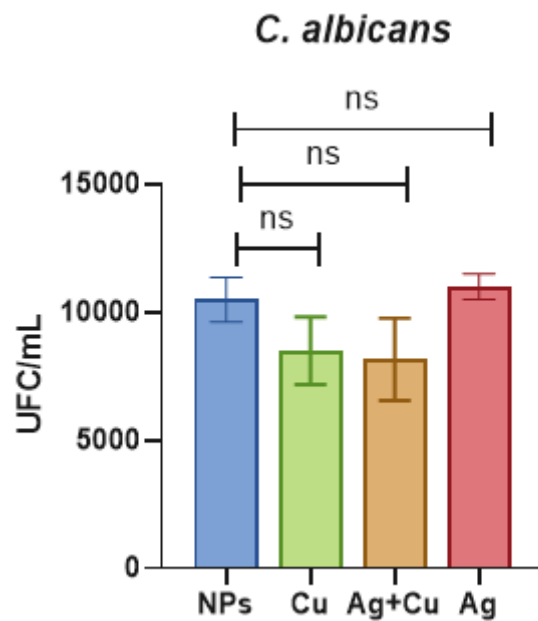


Figura 4.28: Gráfica de la evaluación de los sustratos frente al microorganismo C. albicans, “ns” indica que no hay una diferencia significativa en la comparativa. El sustrato nombrado “Ag+Cu” mostró una mayor capacidad bactericida frente a los demás sustratos evaluados.

4.6 ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DEL COMPORTAMIENTO CELULAR FRENTE A LOS SUSTRATOS MODIFICADOS

Las características y parámetros necesarias para que un biomaterial responda efectivamente y sea biocompatible deben considerar las propiedades celulares y la interacción con el entorno fisiológico. A menudo los biomateriales suelen estar en contacto por periodos prolongados con células, tejidos y sangre, la respuesta de los tejidos circundantes como lo son el tejido cardiovascular o de hueso, se puede derivar, dependiendo del comportamiento, en biointegración completa (toxicidad e inflamación sin relevancia o inexistente) o en el proceso de rechazo encapsulamiento y expulsión del cuerpo extraño (respuesta inmune), finalmente, en el peor de los casos, necrosis (muerte del tejido circundante por efecto tóxico) y/o carcinogenicidad (cáncer causado por efecto de la interacción del biomaterial con los tejidos). Es por ello que se debe considerar para el diseño de los biomateriales el conocimiento de la respuesta física y química de la interface entre los grupos celulares y demás elementos que estarán interactuando con los mismos. Como parte experimental e introductoria al estudio de ingeniería de tejidos de este trabajo de tesis, se evaluó la respuesta citotóxica de los sustratos con respecto a la línea celular RAW 264.7, que corresponde a macrófagos murinos de ratón. La aplicación de esta línea celular es apropiada y relevante, dado que los macrófagos tienen una función muy importante en la cicatrización normal de heridas y el proceso de reparación alrededor de los implantes. Estas células también están involucradas en la inflamación (respuesta del sistema inmune altamente coordinada), los macrófagos suelen estar en reposo, pero la integración de un biomaterial y su interacción con el tejido circundante, pueden activarlos y en respuesta a esta interacción liberar moléculas (citocinas [interleucina (IL)-1 β , IL-6 y factor de necrosis tumoral (TNF)- α] y quimiocinas; proteína quimioatrayente de monocitos-1 y proteína inflamatoria de macrófagos-1 α),

las cuales estimulan el proceso de inflamación, fibrosis o necrosis del tejido que rodea al implante. Además, estas células actúan como la línea principal del sistema inmune, la respuesta de rechazo que ellas ejercen puede ser mediada por la superficie del material, permitiéndole regular su producción de moléculas y madurar a una forma de macrófago M2. [49-51]. El fenotipo M2 se asocia a la resolución de la inflamación y la curación del tejido, por ello analizar su comportamiento frente a los sustratos es de suma importancia. Cabe mencionar que son necesarios ensayos más exhaustivos para poder describir el proceso de inicio y la regulación de la respuesta adaptativa, función que promueven los macrófagos (M1, M2) y determinar su evolución en respuesta a la interacción con los sustratos modificados.

A continuación, se presentan los resultados de los análisis de microscopías a cuatro horas de incubación sobre los sustratos con el objetivo de identificar la formación de puntos de adhesión y la gráfica MTT a 24 h. En la serie de micrografías que se describen en la *Figura 4.29*, se pueden observar cambios significativos en la morfología de las células, ya que su comportamiento frente a la integración y adaptación a la superficie es diferente en cada sustrato, de manera que existe una relación muy estrecha entre la modificación de los sustratos y su comportamiento de integración a la superficie de los mismos.

En la *Figura 4.29* se muestran cuatro micrografías identificadas con letras A (sustrato control NPs), B (sustrato dopado con nanopartículas de Ag), C (sustrato dopado con nanopartículas de Cu) y D (sustrato dopado con nanopartículas de Ag y Cu), cabe mencionar que todas las micrografías mostradas llevan este orden. Es importante destacar que cada micrografía muestra diferencias, particularmente la señalada con la letra D que corresponde al sustrato dopado con ambos metales, las células se ven menos aplanadas y de formas redondeadas a diferencias de las otras micrografías.

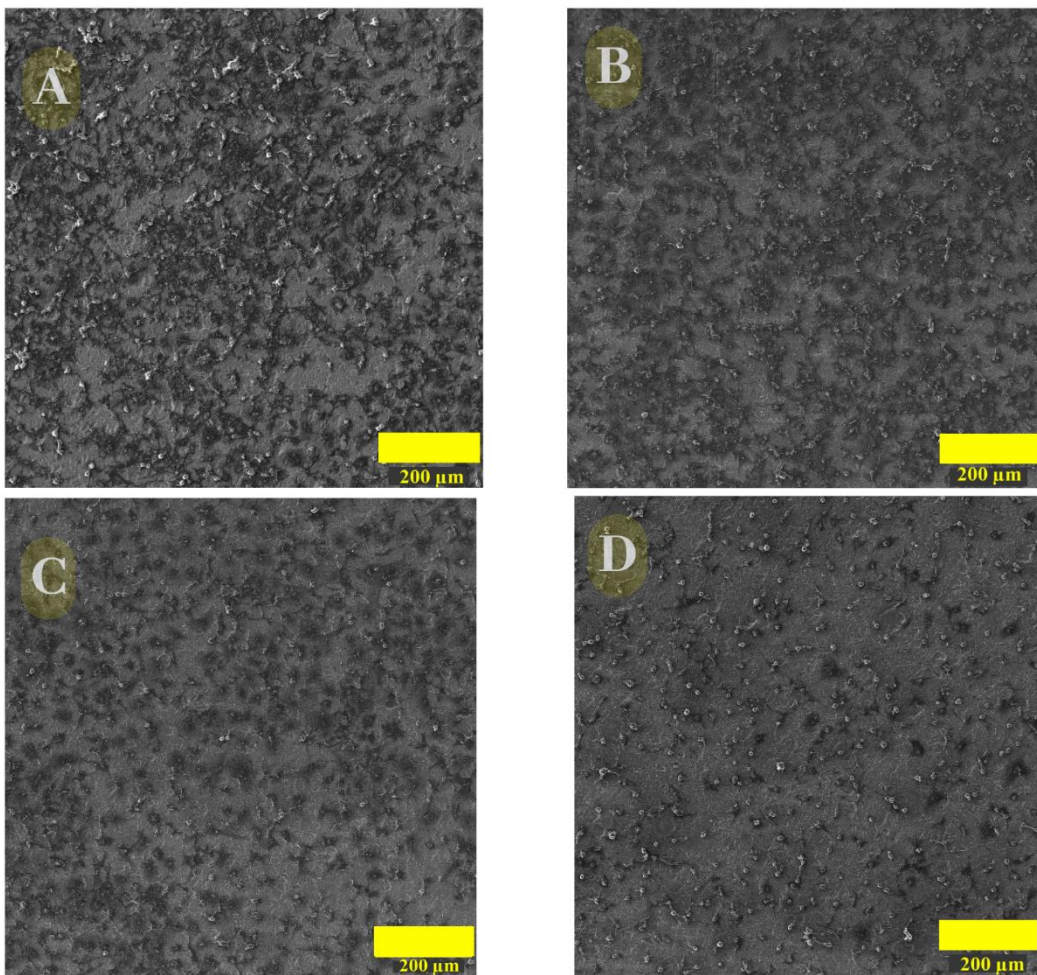


Figura 4.29: Micrografías de FE-SEM a 4 h de cultivo de macrófagos sobre la superficie de los sustratos modificados. La morfología y proliferación celular se muestra en las cuatro superficies con los diferentes tratamientos. A) muestra la morfología de las células en la superficie dopadas con NPs. B) indica la proliferación en el sustrato nanopartículas de Ag. C ilustra la superficie con nanopartículas de Cu y D con el sustrato dopado Ag+ Cu.

En la *Figura 4.30* se muestran cuatro micrografías identificadas con letras A (sustrato control NPs), B (sustrato dopado con nanopartículas de Ag), C (sustrato dopado con nanopartículas de Cu) y D (sustrato dopado con nanopartículas de Ag y Cu), cabe mencionar que todas las micrografías mostradas llevan este orden. En este acercamiento podemos observar más claramente la morfología celular en cada sustrato, en los indicados como A, B y C se señalan con flechas amarillas la presencia de filopodios, con círculos amarillo lamelipodios, con círculos anaranjados zonas con la presencia de matriz extra celular (MEC) y finalmente la micrografía D, se marca con círculos rojos la presencia de conexiones entre células. En esta figura observamos que la micrografía D, las células se ven definidas y la presencia de MEC es escasa.

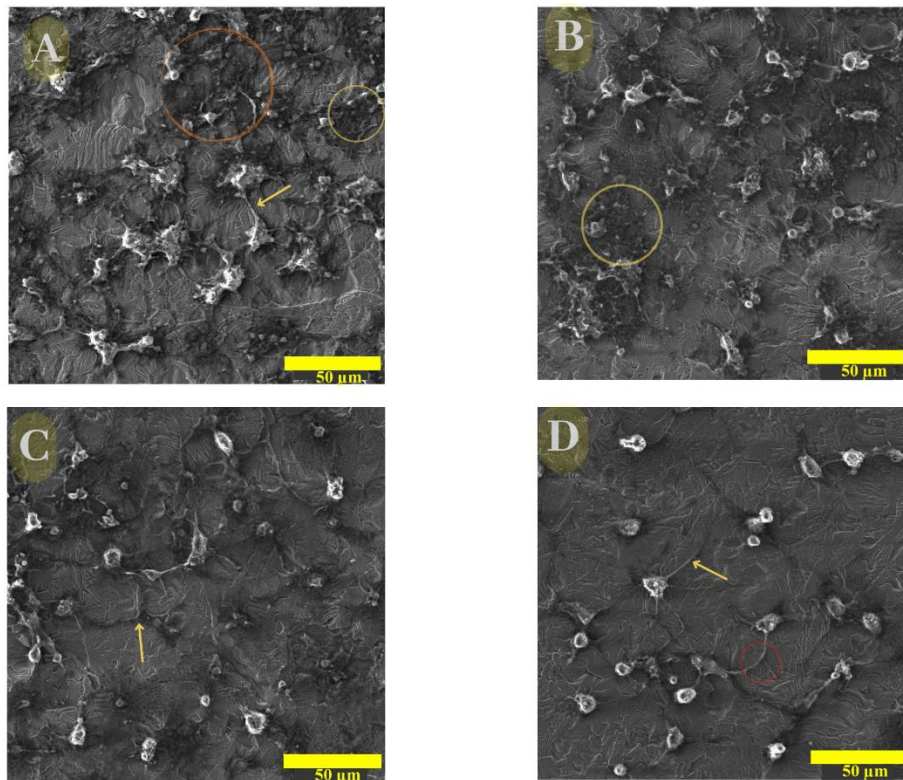


Figura 4.30: Micrografías de FE-SEM a 4 horas de incubación de macrófagos sobre la superficie de los sustratos modificados. En este acercamiento podemos observar más detalladamente la presencia de filopodios (flechas amarillas), lamelipodios (círculos amarillos) conexión entre células (círculo rojo) y presencia de MEC (matriz extra celular). El sustrato NPs señalado con la letra A muestra la aparición de MEC de forma abundante al igual que el sustrato Ag, además de la presencia de filopodios y lamelipodios. El sustrato Cu indicado con la letra C y el sustrato Ag+Cu indicado con la letra D, muestran las conexiones entre células.

En la *Figura 4.31* se muestran cuatro micrografías identificadas con letras A (sustrato control NPs), B (sustrato dopado con nanopartículas de Ag), C (sustrato dopado con nanopartículas de Cu) y D (sustrato dopado con nanopartículas de Ag y Cu). En este acercamiento podemos destacar que la morfología entre el sustrato señalado como A y el señalado como B se aprecian muy similares, es decir; existe una notable formación de matriz extra celular (MEC), también se puede observar que en ambos sustratos las células parecen estar mayormente aplanadas. En los sustratos señalados como C y D se puede observar una morfología celular mayormente definida, protuberante y semiredondeada, existe también la presencia de filopodios, lamelipodios y la presencia de MEC mayormente escasa en la micrografía señalada con la letra D.

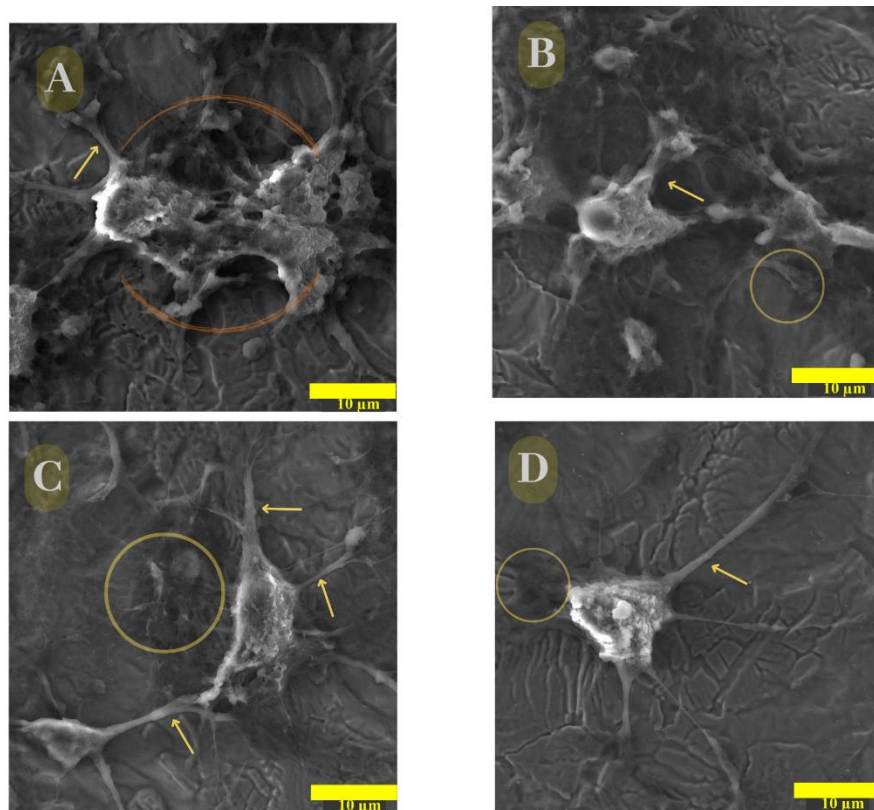


Figura 4.31: Micrografías de FE-SEM de alta magnificación de las superficies experimentales. se puede observar más a detalle el cambio morfológico que experimentan las células en cada uno de los sustratos. D) Se observa el sustrato dopado con Ag+Cu distinguiéndose una célula adherida a la superficie manteniendo una forma más definida y protuberante. Los círculos amarillos muestran la presencia de lamelipodios, prolongaciones anchas y laminares pueden indicar respuesta de cicatrización de heridas. Las flechas amarillas muestran la presencia de microespículas, que promueven la adhesión local al sustrato afirmándola a la superficie celular. El círculo color naranja en el sustrato nanoporoso muestra una MEC más densa en comparación con los demás sustratos.

En la *Figura 4.32* en estas micrografías de alta magnificación podemos observar secciones específicas de las células sobre la superficie de cada sustrato, es importante destacar que la morfología de cada una de ellas cambia de acuerdo al sustrato al que se encuentre adherida. En la micrografía señalada con la letra A, correspondiente al sustrato NPs, se observa el anclaje de la célula a la superficie del material con la presencia de filopodios estirados y mayormente deformados. En la micrografía señalada con la letra B y correspondiente al sustrato Ag, podemos observar la presencia de MEC. En la micrografía señalada con la letra C es evidente la forma del lamelipodio y filopodios que indica el anclaje celular a la superficie del material. Finalmente, la micrografía señalada con la letra D (correspondiente al sustrato nanoporoso Ag+Cu) se observa la morfología de una célula macrófaga protuberante adhiriéndose a la superficie del material.

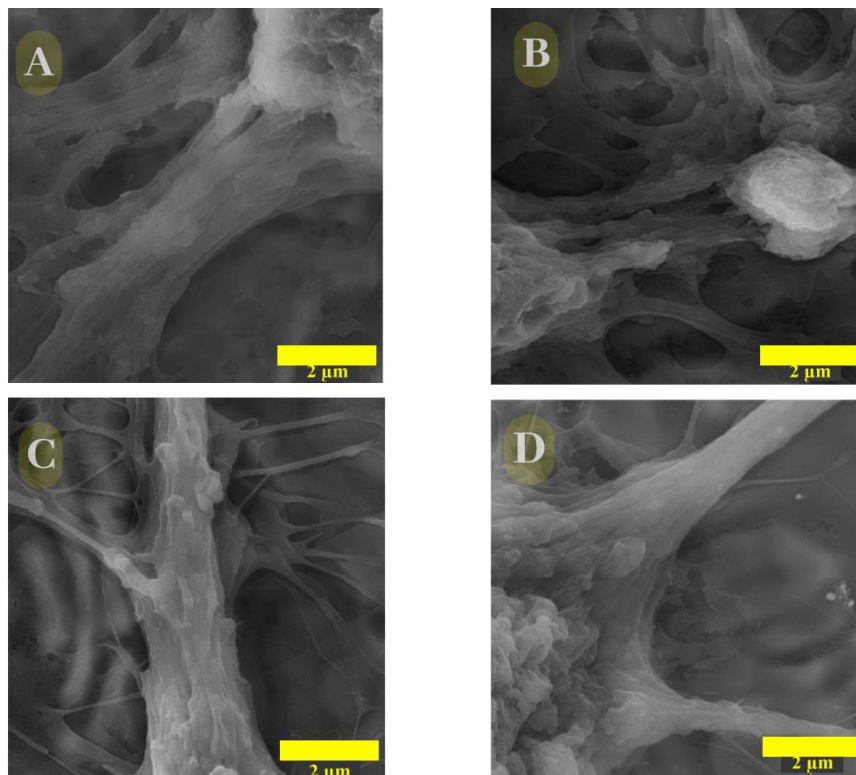


Figura 4.32: Micrografías de FE-SEM a alta magnificación de los macrófagos. A) sustrato NPs morfología celular, B) sustrato dopado con nanopartículas de Ag, conduciendo el anclaje celular, C) sustrato dopado con nanopartículas de Cu magnificación de microespícula celular y filopodios circundantes, D) sustrato dopado con Ag+Cu muestra la morfología del anclaje de una célula a la superficie del material.

En la *Figura 4.33* se muestran cuatro micrográficas de alta magnificación, la señalada con la letra A corresponde al sustrato de NPs, la señalada con la letra B al sustrato Ag, la señalada con la letra C al sustrato Cu, y la señalada con la letra D al sustrato Ag+Cu. En cada una de ellas podemos observar un acercamiento a los filopodios y lamelipodios. Se observa que la morfología de estas partes de la célula se ve diferente en cada sustrato, por lo que podemos inferir que la superficie del material modificado interviene en la morfología antes mencionada.

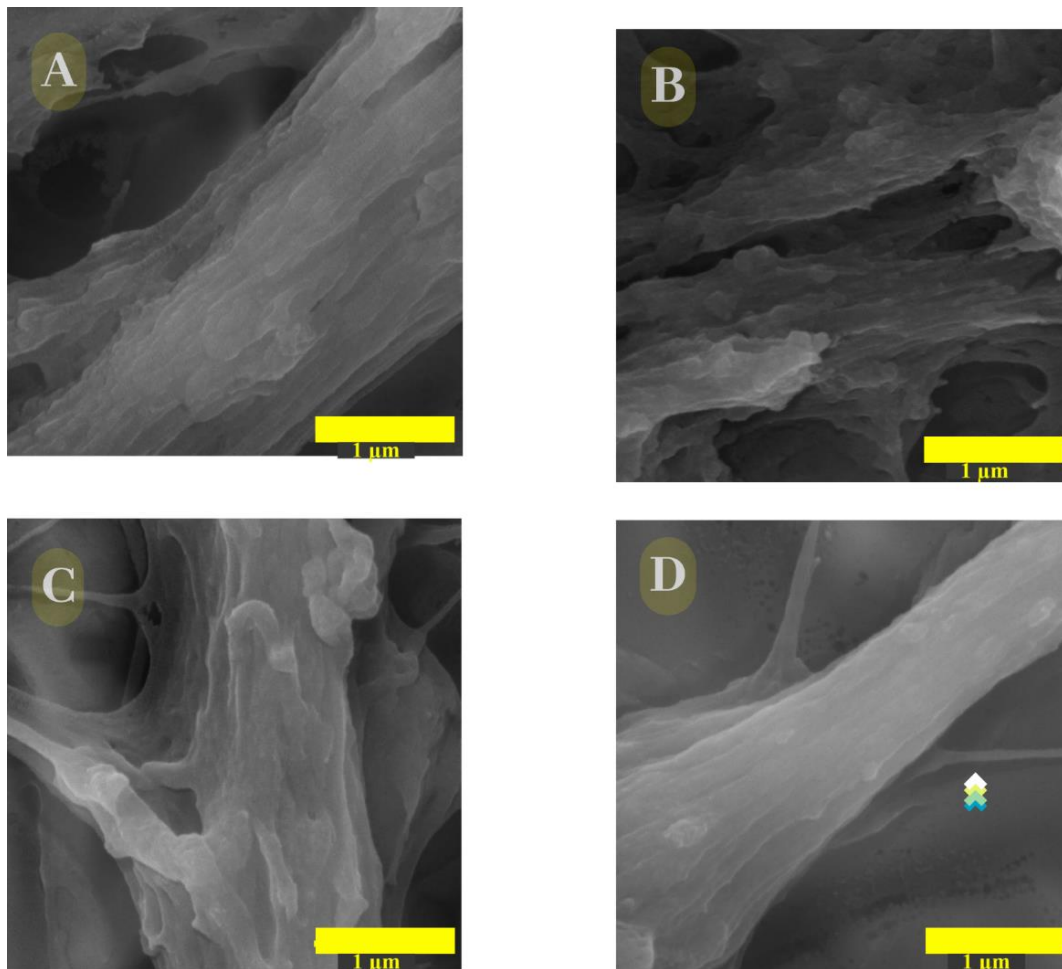


Figura 4.33: Micrográficas de FE-SEM a alta magnificación, el conjunto de imágenes expuestas demuestra las alteraciones en los filopodios de las células macrófagas sobre los materiales nanoestructurados. A: Sustrato NPs, B: Sustrato Ag, C: Sustrato Cu, D: Sustrato Ag+Cu. Se observa una flecha que indica la presencia de lamelipodio.

Las micrografías de FE-SEM descritas anteriormente revelan que existe un cambio morfológico, si se comparan las forma en que se observan las células en cada sustrato. La *Figura 4.31* muestra en el cuadrante identificado como “A” una aparente población celular más abundante respecto a las otras muestras, también es en el sustrato en el que las células se ven con formas más aplanadas e irregulares. Para determinar qué significa o qué provoca estas comparativas morfológicas, se realizó el ensayo MTT que indica si existe viabilidad celular, este parámetro es un indicador predictivo para el buen funcionamiento de los tejidos. En la *Figura 4.34* se determinó que la superficie que promueve una mayor viabilidad celular, o que es menos tóxica para las células, fue la del sustrato dopado con plata y cobre, y la que mostró el efecto contrario fueron los NPs dopado con Ag. También, se puede observar que existen diferencias significativas según la prueba ONE WAY ANOVA entre el sustrato dopado con Ag+Cu y el sustrato dopado con Ag, Cu de forma individual.

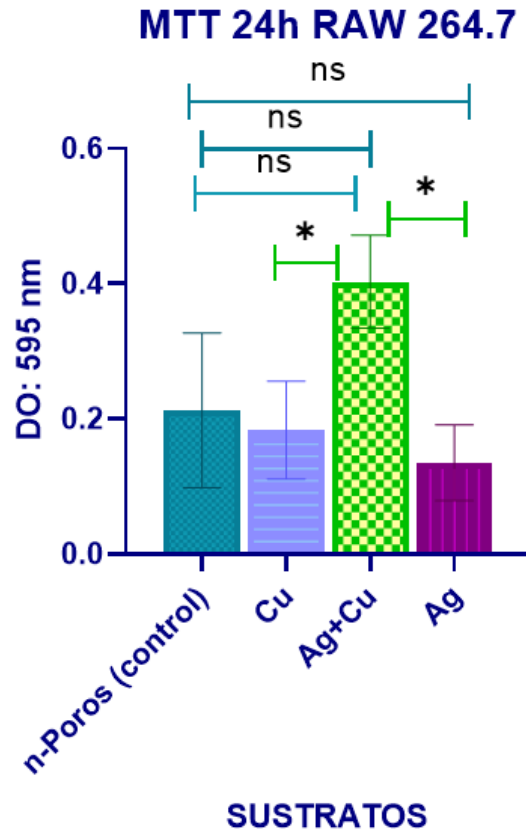


Figura 4.34: Resultados comparativos entre los diferentes sustratos con base a los resultados obtenidos de la prueba MTT. * indica cambios significativos. n.s. sugiere que no hay cambios significativos.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

De acuerdo con la literatura se estima que la demanda de prótesis articulares de remplazo o dentarias está (y seguirá) en aumento constante, razón por la cual el desarrollo de nuevos biomateriales es un campo ampliamente explorable, que tiene como objetivo desarrollar dispositivos médicos con características que les permitan interactuar con el medio biológico, y promuevan una aceptación y recuperación del paciente sin riesgo de fallo.

Este estudio se enfocó en el diseño de un material para su uso como dispositivo médico de reemplazo articular o dental, el cual se basó en seleccionar la aleación Ti-6Al-4V, mismo que fue modificado superficialmente formando una nanotopografía regulada constituida de NPs de TiO₂ y posteriormente un dopaje con nanopartículas de Cu, Ag y Ag+Cu. Uno de los principales objetivos era reducir la proliferación bacteriana sobre la superficie del material, es decir, dotar al material de capacidades bactericidas, dado que uno de los factores más importantes en el fallo de los implantes se debe a infecciones bacterianas o las causadas por hongos y en algunos casos la combinación de ambas. El resultado de las modificaciones explicadas en el párrafo anterior nos llevó a encontrar respuestas derivadas de los estudios realizados de microorganismos nosocomiales contra los sustratos realizados, y nos relatan un impacto considerable frente a la reducción bacteriana en los sustratos, e incluso en algunos casos, la reducción total de microorganismos sobre la superficie del material. Los resultados obtenidos de los estudios microbiológicos resaltan que el dopaje con Ag+Cu presenta el mayor poder antimicrobiano. Por otra parte, el método de oxidación química controlada permitió obtener NPs de alrededor de 25 nm (información que coincide con lo reportado por otros grupos de investigación). Además, el material fue sometido a un segundo tratamiento, el cual permitió integrar nanopartículas de plata, cobre y la combinación de ambas

sobre la superficie de los NPs, cuyo análisis estadístico mostró que el tamaño de las nanopartículas se encontraba en un rango de entre 20 nm a 200 nm, la distribución normal indicó que los tamaños con una mayor probabilidad de formarse son de entre 60 a 75 nm, los estudios de FE-SEM y EDS indicaron una morfología esférica y la presencia de Ag y Cu sobre las respectivas superficies. En conjunto con estos resultados los estudios de XRD revelaron la presencia de diferentes formas de TiO₂, así como de Ag y Cu. Es importante mencionar que está descrito en la literatura que los metales y óxidos de metales presentan actividad antimicrobiana, ya que son agentes inorgánicos con actividad de amplio espectro que afectan a bacterias, hongos y virus, especialmente eficaces contra *E. coli* y SARM, aunque en este estudio se demuestra que también tienen efecto total frente a *P. aeruginosa* y *S. enterica*. Por otra parte, también se detectó fuerte actividad contra *S. epidermidis*, *K. pneumoniae*, y *C. albicans*, de esta forma se demostró que de la actividad de bacterias Gram negativas como Gram positivas, se ve dañada su proliferación y adhesión a la superficie del material.

Las dos vías propuestas para generar un efecto bactericida promovido por las superficies, son: la primera siendo la basada en la inhibición de la formación de biopelícula (impidiendo la colonización de bacterias), y la segunda (se puede argumentar preferible) la basada en la inhibición de la adhesión inicial de las bacterias a la superficie del material. Se ha descrito que este efecto bactericida está estrechamente relacionado con la liberación de iones de Ag y Cu [52, 53], que juegan un rol crítico en el enlace intracelular de grupos biológicos, como proteínas y ácidos nucleicos, interfiriendo con el funcionamiento óptimo de los procesos celulares de los microorganismos, ocasionando la muerte celular [54]. Los iones de Ag provocan una inhibición en la actividad enzimática del microorganismo incluyendo las cadenas respiratorias, así también como las proteínas en la membrana celular bacteriana. Algunos metales pueden incluso iniciar

estrés oxidativo por la generación directa de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés).

Se describe que las nanopartículas de Ag y de Cu, al traspasar la capa de peptidoglicano y la membrana celular, la fuerza motriz del protón se ve alterada, por lo que es capaz de frenar la síntesis de ATP, esto impide que el ADN se replique, lo que conlleva también a la muerte celular [55- 57]. Este daño se genera a nivel de las membranas celulares cuando las nanopartículas se unen a los grupos tiol (-SH) promoviendo la desnaturalización de las proteínas, lo que en consecuencia permite que los iones de plata se conduzcan al interior de la célula [58]. Otro mecanismo que se propone es el que provoca la forma anatasa de TiO_2 , cuyo daño en las células bacterianas se ve efectuado por las ROS generadas [59-62]. Dicho elemento fue encontrado en las superficies de los sustratos como se describe en los estudios de XRD.

Las nanopartículas que llevan CuO en su composición, cuentan con iones Cu^{2+} que son liberados dentro de las bacterias y hongos al igual que los iones Ag^+ ; sin embargo, la diferencia radica en la capacidad de ser solubles puesto que esto nos permite saber cómo será la liberación de los mismos. Al tratarse de Cu^{2+} se refiere a que es poco soluble por lo que la liberación de dichos iones será prolongada, lo que afecta la estabilidad de las nanopartículas. La síntesis de nanopartículas de Cu resulta ser más compleja, puesto que se debe evitar la formación de nanopartículas de CuO y de CuO_2 , que resultan ser tóxicas para el organismo [63-65]. Respecto a la reacción de los sustratos nanoporosos dopados con nanopartículas de Cu; en este estudio se encontró que promueven mayor inhibición comparando los sustratos nanoporosos dopados con nanopartículas de Ag. En todos los ensayos con microorganismos se presentó este efecto. Por otro lado, es de suma importancia entender el comportamiento que tienen estas superficies frente a la exposición con células mamíferas, por lo que en el apartado 4.4 se describe el estudio de citotoxicidad realizado con

células macrófagas RAW 254.7 en el que se observa esta misma ventaja de los NPs dopados con nanopartículas de Cu, contra los de Ag, lo que se traduce en que esta modificación potencia una mejor proliferación celular. También, es relevante subrayar que la combinación del dopaje de nanopartículas de Ag+Cu muestran un efecto bactericida aún mejor que las nanopartículas metálicas individuales, y una reactividad toxica notablemente menor para las células (sugiriendo así una ventaja tangible del uso de este compuesto). Este hallazgo puede ser por efecto de la cantidad de óxidos de metales encontrada en la superficie de los NPs, agregando también la característica de ser un material mejorado respecto a su capacidad de humectabilidad descrita en el estudio de ángulo de contacto. Incluso se puede hipotetizar que la configuración elemental entre Ag y Cu, permite que la Ag recubra al Cu, lo que resulta en la potencialización del efecto antibacteriano y la nula citotoxicidad. Sin embargo, se recomiendan más estudios con el objetivo de explicar estos importantes hallazgos.

RECOMENDACIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

Debido a la capacidad bactericida de amplio espectro encontrada en este estudio y la eficiente proliferación celular de acuerdo a los ensayos de MTT se sugiere las superficies dopadas con Ag+Cu presentan un fuerte potencial como material para el diseño de prótesis articulares de remplazo o para remplazo dental. Sin embargo, se requieren de más estudios celulares, principalmente de nivel ósea, utilizando modelos osteoblásticos de maduración de hueso para entender el comportamiento de este material. Por lo que se recomienda llevar a cabo estudios osteogénicos para determinar la funcionalidad ósea. Por otra parte, también se recomienda realizar estudios de citometría de flujo para describir qué mecanismos del ciclo celular se ven afectados por dicho material y así como análisis de hemocompatibilidad.

REFERENCIAS

- [1]. C. Allyson Jones, P. L.-A. (2007). Total Joint Arthroplasties: Current Concepts of Patient Outcomes after Surgery. *ELSEVIER: RHEUMATIC DISEASE CLINICS OF NORTH AMERICA*, 71-86.
- [2]. Rabih O. Darouiche, M. (2004). Treatment of Infections Associated with Surgical Implants. *The NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE*, 1422-1429.
- [3]. Raju Vaishya, R. S. (2019). Laboratory diagnosis of Prosthetic Joint Infections: Current concepts and present status. *ELSEVIER: CLINICALS ORTHOPAEDICS AND TRAUMA*, 560-565.
- [4]. Benjamín Valdez-Salas, E. B.-Á. (2018). Controlled antifungal behavior on Ti6Al4V nanostructured by chemical nanopatterning. *MATERIALS SCIENCE & ENGINEERING.*, 50-62.
- [5]. Mitsuo Niinomi, T. N. (2015). *ADVANCES IN METALLIC BIOMATERIALS: PROCESSING AND APLICCATIONS*. Japón: Springer.

- [6] Mohamad Mohsen Momenin, Y. (2015). Fabrication and characterization of copper doped TiO₂ nanotube arrays by insitu electrochemical visible light photocatalyst. CERAMICS INTERNATIONAL, 50-62.
- [7] Linhua Li, Y. X. (2015). The Effects of Cu-doped TiO₂ Thin Films on Hyperplasia, Inflammation and Bacteria Infection. APPLIED SCIENCE.
- [8] David F. Williams. (2008). On the mechanisms of biocompatibility. ELSEVIER BIOMATERIALS, 2941-2953.
- [9] KAY C. DEE, DAVID A. PULEO, (2003) AN INTRODUCTION TO TISSUE-BIOMATERIAL INTERACTIONS. JOHN WILEY & SONS, 248 PÁG.
- [10] M. Türkay Aytekin Aydın, H. L. (2018). Synthesis, characterization and antibacterial activity of silver doped TiO₂ nanotubes. ELSEVIER.
- [11]. Melo, M. E. (2013). Ingeniería y biomateriales. Ingeniería y biomateriales, 68- 90.
- [12]. Gustavo A. Abraham, M. F. (2001). HACIA NUEVOS BIOMATERIALES APORTES DESDE EL CAMPO DE LA QUÍMICA MACROMOLECULAR. Investigación Química.

- [13]. Concepción Pérez-Jorge, A. C.-T.-B. (2012). In vitro assessment of Staphylococcus epidermidis and Staphylococcus aureus adhesion on TiO₂ nanotubes on Ti 6Al–4V alloy. Society For Biomaterial, 50-62.
- [14]. Rodil, S. E. (2009). MODIFICACIÓN SUPERFICIAL DE BIOMATERIALES METÁLICOS. Metalurgia y Materiales, 67-83.
- [15]. Gómez, S. B. (2014). Modificación superficial de biomateriales metálicos (316 LVM y Ti6Al4V) mediante granallado, agua a alta presión y laser peening: efecto en la microestructura, las propiedades mecánicas y la liberación de iones. Madrid: Departamento de Ciencia de los Materiales e Ingeniería Metalúrgica.
- [16]. Benjamín Valdez-Salas, E. B.-Á. (2017). IN VITRO ASSESSMENT OF EARLY BACTERIAL ACTIVITY ON MICRO/NANOSTRUCTURED TI6AL4V SURFACES, MOLECULES.
- [17]. Kolter, P. W. (2000). Biofilm, City of Microbes. Journal of Bacteriology, 2675-2679.

[18]. Jyotsna Chandra, D. M. (2001). Biofilm Formation by the Fungal Pathogen *Candida albicans*: Development, Architecture, and Drug Resistance. *Journal of Bacteriology*, 5385-5394.

[19]. Melphine M. Harriott, M. C. (2011). Importance of *Candida*-bacterial polymicrobial biofilms in disease. *Trends in Microbiology*, 557-563.

[20]. Clarissa J. Nobile, J. E. (2006). Function of *Candida albicans* Adhesin Hwp1 in Biofilm Formation. *Eukaryot Cell*, 1604-1610.

[21]. One MaiP, (2008). *Fundamentals of Microbiology*, Pearson Education Inc.:86.

[22]. Oldani, C. (2014). El camino del titanio como material de reemplazo óseo. FCEF Y N.

[23]. Lera, D. D. (2013). *Biomateriales: el Titanio en Odontología*. UNIVERSIDAD DE SALAMANCA, 233-258.

[24]. D.M. Brunette, P. T. (2012). *Titanium in Medicine: Material Science, Surface Science, Engineering, Biological Responses and Medical Applications*. Berlin: Springer Science & Business Media.

[25]. Ernesto Beltrán-Partida, A. M.-U.-S. (2015). Improved Osteoblast and Chondrocyte Adhesion and Viability by Surface-Modified Ti6Al4V Alloy with Anodized TiO₂ Nanotubes Using a Super-Oxidative Solution. MDPI, 867-883.

[26]. ZX Chen, Y. T. (2009). Surface characteristics and in vitro biocompatibility of titanium anodized in a phosphoric acid solution at different voltages.

IOPSCIENCE: Biomedical Materials.

[27]. G, M. A. (2008). MODIFICACIÓN DE SUPERFICIES DE BIOMATERIALES. Revista Iberoamericana de Polímeros.

[28]. Pacha Olivenza, M. A. (2012). Caracterización y respuesta antibacteriana de la superficie del biomaterial TI6AL4V sometido a diferentes modificaciones físicas. 50-66.

[29]. Roger López Padilla, R. L. (2018). Estructuras de titanio con gradiente de porosidad – fabricación por el método de partículas espaciadoras y caracterización. Scielo.

- [30]. C.P.Ferreira, M. R. (2013). Effects of substrate microstructure on the formation of oriented oxide nanotube arrays on Ti and Ti alloys. *Applied Surface Science*, 226-234.
- [31]. C. Veiga, J. D. (2012). Properties And Applications Of Titanium Alloys: A Brief Review. *Mechanical Engineering*, 133-148.
- [32]. Costerton, J. (1999). Introduction to biofilm. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 217–221.
- [33]. Clarissa J. Nobile, J. E. (2006). Function of Candida albicans Adhesin Hwp1 in Biofilm Formation. *Eukaryot Cell*, 1604-1610.
- [34]. G. O’Toole, H. K. (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annual Review of Microbiology*, 49-79.
- [35]. J.F. Fisher, S. M. (2010). Astellas USA foundation award: Host–guest. *American Chemical Society*, 4813–4829.
- [36]. Melo, M. E. (2013). Ingeniería y Biomateriales. *Ingeniería y Biomateriales* , 68-90.

- [37]. Mitsuo Niinomi, T. N. (2015). IN METALLIC BIOMATERIALS: PROCESSING AND APLICCATIONS. *Springer*.
- [39]. N. Karamanos, H. P. (1994). Identity of macromolecules present in the extracellular slime layer of *Staphylococcus epidermidis*. *Biochimie*, 217-224.
- [40]. One, M. (2008). *Fundamentals of Microbiology*. Washington, D.C.: Pearson Education.
- [41]. Gurpreet Singh, N. S. (2020). Design, development and tribological characterization of Ti-6Al-4V/ hydroxyapatite composite for bio-implant applications. *ELSEVIER: MATERIAL CHEMISTRY AND PHYSICS*, 243.
- [42]. Renu Kumari, T. S. (2015). Laser Surface Textured Titanium Alloy (Ti-6Al-4V). *Applied Surface Science*.
- [43]. Benjamín Valdez Salas, E. B. (2021). Feasibility of Using H₃PO₄/H₂O₂ in the Synthesis of Antimicrobial TiO₂ Nanoporous Surfaces. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 8.
- [44]. Butt, M. P.-J. (1998). Measuring the Contact Angle of Individual Colloidal Particles. *JOURNAL OF COLLOID AND INTERFACE SCIENCE*, 468–477.

[45]. Tammar S. Meiron, A. M. (2004). Contact angle measurement on rough surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*, 637–644.

[46]. Yoshikimi Uyama, H. I. (1991). Copararison of Different Methods for Contact Angle Measurement. *JOURNAL OF COLLOID AND INTERFACE SCIENCE*, 5.

[47]. Andrei A. Bunaciu, E. G.-e. (2015). X-RAY DIFRACCTION: INSTRUMENTATION AND APPLICATIONS. *CRITICAL REVIEWS IN ANALYTICAL CHEMISTRY*, 289-299.

[48]. Minashi A. Thakar, S. S. (2021). X ray diffraction (XRD) analysis and evaluation of antioxidant activity of copper oxide nanoparticles synthesized from leaf extract of *Cissus Vitiginea*. *MATERIALS TODAY*, 2214-7853.

[49]. Kobayash, N. F. (2005). Macrophages in Inflammation. *Current Drug Targets*, 281-286.

[50]. Robert J. Snyder John Lantis, R. S. (2016). Macrophages: A review of their role in wound healing and their therapeutic use,. *Wound Healing* , 613–629.

[51]. Slava Epelman, K. J. (2016). Origin and Functions of Tissue Macrophages. *CellPress*, 1-18.

- [52]. Ivan Sondi, a. B.-S. (2004). Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E. coli as a model for Gram-negative bacteria. *Journal of Colloid and Interface Science*, 177-182.
- [53]. Jiaying Wang, J. (2016). Silver-nanoparticles-modified biomaterial surface resistant to staphylococcus: new insight into the antimicrobial action of silver . *NATURE* , 1-16.
- [54]. Juliana Gaviria, A. A.-O. (2006). Synthesis and deposition of silver nanoparticles on porous titanium substrates for biomedical applications. *Biomateriales Avanzados y Medicina Regenerativa*, 1-33.
- [55]. Feng Zhang, G. W. (2001). Surface properties of silver doped titanium oxide films. *Surface and Coatings Technology*, 65-70.
- [56]. Kholoud M.M. Abou El-Nour, A. E.-W. ((2010)). Synthesis and applications of silver nanoparticles. *Arabian Journal of Chemistry*, 135–140
- [57]. Juliana Gaviria, A. A.-O. (2021). Biofunctionalization of Porous Ti Substrates Coated with Ag Nanoparticles for Potential Antibacterial Behavior,. 1-15.

[58]. Jie Li, B. X. (2018). Enhanced Antibacterial Activity of Silver Doped Titanium Dioxide-Chitosan Composites under Visible Light . *Material Basel, Switzerland*, 1403.

[59]. Nathan A. Trujillo, R. A. (2012). Antibacterial effects of silver-doped hydroxyapatite thin films sputter deposited on titanium. *Materials Science and Engineer*, 2135-2144.

[60]. Besinis, A., Hadi, S. D., Le, H. R., Tredwin, C., & Handy, R. D. (2017).

Antibacterial activity and biofilm

inhibition by surface modified titanium alloy medical

implants following application of silver, titanium dioxide and hydroxyapatite

nanocoatings. *Nanotoxicology*, 11(3), 327–338

[61]. A. Besinis, S. D. (2017). Antibacterial activity and biofilm inhibition by

surface modified titanium alloy medical implants following application of silver,

titanium dioxide and hydroxyapatite. *Nanotoxicology*, 327-338.

[62]. S. Iravani, H. K. (2014). Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical

and biological methods. *Research in Pharmaceutical Sciences* , 385-406.

- [63]. Liao Juan Zhu, Z. M. (2018). Deposition of silver nanoparticles on titanium surface for antibacterial effect. *International Journal of Nanomedicine*, 261–267.
- [64]. Michael Seery, R. G. (2007). Silver Doped Titanium Dioxide Nanomaterials for Enhanced Visible Light Photocatalysis. *Journal of Photochemistry and Photobiology.*, 258-263.
- [65]. Alina Nastaca Coman, A. M. (2021). „Silver-Deposited Nanoparticles on the Titanium Nanotubes Surface as a Promising Antibacterial Material into Implants. *Metals*, 1-16.
- [66]. Duguid, I. G., Evans, E., Brown, M. R., & Gilbert, P. (1992). Effect of biofilm culture upon the susceptibility of *Staphylococcus epidermidis* to tobramycin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 30(6), 803-810.
- [67]. Donlan, R. M., & Costerton, J. W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical microbiology reviews*, 15(2), 167-193.
- [68]. Costerton, J. W., Stewart, P. S., & Greenberg, E. P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science (New York, N.Y.)*, 284(5418), 1318–1322.

- [69]. Rijnaarts, H. H., Norde, W., Bouwer, E. J., Lyklema, J., & Zehnder, A. J. (1995). Reversibility and mechanism of bacterial adhesion. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 4(1), 5-22.
- [70]. Gottenbos, B., Busscher, H. J., Van Der Mei, H. C., & Nieuwenhuis, P. (2002). Pathogenesis and prevention of biomaterial centered infections. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 13(8), 717-722.
- [71]. Mayer, C., Moritz, R., Kirschner, C., Borchard, W., Maibaum, R., Wingender, J., & Flemming, H. C. (1999). The role of intermolecular interactions: studies on model systems for bacterial biofilms. *International journal of biological macromolecules*, 26(1), 3–16.
- [72]. Mack, D. (1999). Molecular mechanisms of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation. *Journal of Hospital Infection*, 43, S113-S125.
- [73]. Wang, X., Preston, J. F., 3rd, & Romeo, T. (2004). The pgaABCD locus of *Escherichia coli* promotes the synthesis of a polysaccharide adhesin required for biofilm formation. *Journal of bacteriology*, 186(9), 2724–2734.

[74]. Duddridge, J. E., Kent, C. A., & Laws, J. F. (1982). Effect of surface shear stress on the attachment of *Pseudomonas fluorescens* to stainless steel under defined flow conditions. *Biotechnology and bioengineering*, 24(1), 153–164.

[75]. Yoon-Chae Nah, I. P. (2010). Doped TiO₂ and TiO₂ Nanotubes: Synthesis and Applications. *CHEMPHYSICHEM*, 2698-2713